

**DER EINFLUSS VON
POLYPEPTIDHORMONEN
AUF DIE INSULINSEKRETION.
UNTERSUCHUNG AN
PERIFUNDIERTEN RATTENINSELN**

Axel Witte

1977

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR : PROFESSOR DR. E.BUCHBORN

DER EINFLUSS VON POLYPEPTIDHORMONEN AUF DIE INSULINSEKRETION.
UNTERSUCHUNG AN PERIFUNDIERTEN RATTENINSELN

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

AXEL WITTE

AUS MÜNCHEN

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doiz.Dr. R.Landgraf
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. W.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.1977



MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0050

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1. Regulation der Insulinsekretion	1
1.2. Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion der Langerhans'schen Inseln und deren methodische Schwierigkeiten	4
1.3. Hormonelle Beeinflussung der Insulinsekretion	5
1.4. Zweck dieser Arbeit	11
 <u>2. METHODIK</u>	 13
2.1. Material	13
2.2. Isolation der Langerhans'schen Inseln	13
2.2.1. Tiere	13
2.2.2. Anästhesie und Vorbehandlung	14
2.2.3. Operation	15
2.2.4. Collagenaseverdauung	17
2.3. Versuchsaufbau und Durchführung der Perifusion	19
2.3.1. Versuchsaufbau	19
2.3.2. Experimentelles Vorgehen bei der Perifusion	21
2.3.2.1. Oxygenierung der Perifusionslösung und Konstanthaltung des pH	21
2.3.2.2. Umschaltventil	22
2.3.2.3. Perifusion der Pankreasinseln	24
2.3.2.4. Experimentelle Durchführung der Perifusion	26
2.4. Zusammensetzung der Perifusionslösungen	28
2.5. Insulin-Radioimmunoassay	28
2.6. Stabilität der Testhormone während der Perifusion	29
2.7. Ablauf der Experimente und Auswertung der Ergebnisse	30
2.7.1. Ablauf der Experimente	30
2.7.1.1. Untersuchung des Einflusses der Testhormone auf die basale Insulinsekretion	30
2.7.1.2. Untersuchung der Wirkung der Testhormone auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	30

2.7.1.3.	Untersuchung der Wirkung einer Präperifusion der Testhormone auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion	30
2.7.2.	Auswertung der Ergebnisse	31
<u>3.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	32
3.1.	Glukose-induzierte Insulinsekretion	32
3.2.	Einfluß von Wachstumshormon (hGH) auf die Insulinsekretion	36
3.2.1.	Einfluß von hGH auf die basale Insulinsekretion	36
3.2.2.	Einfluß von hGH auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	38
3.2.3.	Einfluß einer Präperifusion mit hGH auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion	38
3.3.	Einfluß von Adiuretin (ADH) auf die Insulinsekretion	43
3.3.1.	Einfluß von ADH auf die basale Insulinsekretion	43
3.3.2.	Einfluß von ADH auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	43
3.3.3.	Einfluß einer Präperifusion mit ADH auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion	47
3.4.	Einfluß von Lipotropin auf die Insulinsekretion	48
3.4.1.	Einfluß von Lipotropin auf die basale Insulinsekretion	48
3.4.2.	Einfluß von Lipotropin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	50
3.4.3.	Einfluß einer Präperifusion mit Lipotropin auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion	51
<u>4.</u>	<u>DISKUSSION</u>	54
4.1.	Wachstumshormon (hGH) und Insulinsekretion	54
4.2.	Adiuretin (ADH) und Insulinsekretion	57
4.3.	Lipotropin und Insulinsekretion	60
<u>5.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	64
<u>6.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	66

1.

EINLEITUNG

1.1.

Regulation der Insulinsekretion

Zwar wird der Diabetes mellitus schon in frühesten medizinischen Quellen erwähnt, jedoch bedeutete erst die Entdeckung der Pankreasinseln durch LANGERHANS 1869 (1) und die Untersuchungen von MINKOWSKI und MERING (2) den entscheidenden Fortschritt in der Entdeckung der Zuckerkrankheit. Letztere konnten durch totale Pankreatektomie bei Hunden einen Diabetes mellitus hervorrufen und legten so am Ende des letzten Jahrhunderts die Grundlage für die Erforschung der zentralen Bedeutung des endokrinen Pankreas für den Stoffwechsel des Organismus. Es sollten jedoch noch einige Jahrzehnte vergehen, bis BANTING und BEST 1922 (3) das chemische Substrat der Pankreaswirkung, das Insulin, isolieren konnten und es schließlich SANGER 1959 gelang (4), die Aminosäuresequenz dieses Hormons darzustellen.

Die Bedeutung der Diabetesforschung ergibt sich aus der Tatsache, daß mit der Zunahme der Diabetes-Morbidität in Deutschland nach dem Kriege mittlerweile 2 - 3 % der Gesamtbevölkerung unter der Zuckerkrankheit leiden. Besonders gravierend wiegt auch die Beobachtung, daß sich nicht nur die Zahl der Altersdiabetiker erhöht, was wohl primär auf die veränderten Lebensbedingungen nach dem Kriege zurückzuführen ist, sondern die pathologische Hyperglykämie zunehmend auch bei Jugendlichen auftritt. Dies wird ebenfalls in der Todesursachenstatistik deutlich: 1969 stand der Diabetes an 9. Stelle der häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland (5). Durch intensive Forschung gelang es nach der Entdeckung des Insulins mittels verbesserter morphologischer und biochemischer Methoden, die periphere Wirkung von Insulin auf den Glukose-, Fett- und Proteinstoffwechsel zu beleuchten und deren vielfältige Störungen beim Diabetiker zu erklären. Den Zusammenhang zwischen dem Blutglukose-Spiegel und der Insulinsekretion beim Diabetiker untermauerten CERASI und LUFT (6). Durch Messung von Glukose und Insulin im Blut während einer kontinuierlichen Glukoseinfusion zeigten sie, daß bei Zuckerkranken im Vergleich zu einem Normalkollektiv die Insulinsekretion verzögert eintritt und insgesamt vermindert ist. Die

inadäquate und verminderte Insulinsekretion mit relativem oder absolutem Insulinmangel ist somit die Ursache eines Diabetes.

Eine entscheidende Frage für die Entstehung des Insulinmangels ist die Aufdeckung des Sekretionsmechanismus dieses Hormons. DUNN et al. (7) gelang es 1943 durch selektive Schädigung der beta-Zellen der Pankreasinseln mit Alloxan diese als Ort der Insulinbiosynthese und Insulinfreisetzung zu identifizieren. Voraussetzung für die Aufklärung der möglichen Ursachen der Hypoinsulinämie beim Insulinmangel-Diabetes ist die Physiologie und Biochemie der beta-Zellen beim Gesunden genau zu kennen. Dabei interessierte nicht nur die Frage, welche Substanzen (Metabolite, Hormone, Neurotransmitter, Pharmaka) die Insulinsekretion stimulieren oder hemmen, sondern auch wie die beta-Zelle diese Substanzen erkennt und schließlich in ein Sekretionssignal transformiert (Problem des "stimulus-secretion coupling").

Der wichtigste Stimulus zur Beantwortung dieser Fragen ist die Glukose, die bei der Perfusion von Rattenpankreatata ein auffallend biphasisches Insulin-Sekretionsmuster zur Folge hat: einer raschen, schnell wieder abfallenden Insulinausschüttung kurz nach Beginn der Stimulierung folgt eine allmählich ansteigende und langsam in ein Plateau einmündende zweite Phase der Insulinsekretion (8). Auf Grund dieser Beobachtung und zahlreicher weiterer Untersuchungen wurde geschlossen, daß für die Insulinfreisetzung aus den beta-Zellen wahrscheinlich zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich sind. Zum einen ein postulierter Rezeptor an der Membran der beta-Zelle, der die Wirkung des Stimulus ins Zellinnere vermittelt (Rezeptor-Theorie), und zweitens das Wirksamwerden eines Stimulus erst nach seiner Metabolisierung in der Zelle (Stoffwechsel-Theorie). Letztere Hypothese wurde vor allem durch GRODSKY et al. (8) gestützt, die zeigen konnten, daß nur metabolisierbare Zucker wie Glukose und Fructose Insulin freisetzen können, wobei RANDLE et al. (9) der Nachweis gelang, daß die Glukose-Oxydation in den Pankreasinseln nach Zugabe von die Insulinsekretion stimulierenden Substanzen gesteigert ist. Ebenfalls in diese Richtung wiesen MALAISSE et al. (10) mit den Befunden, daß Mannoheptulose durch die Verhinderung der Glukosephosphorylierung den potenzierenden Effekt von Glukose und Theophyllin auf die Insulinausschüttung aufhebt. MATSCHINSKY

und ELLERMAN (11) sowie IDAHL (12, 13) fanden einen Anstieg verschiedener Glukosemetaboliten nach Glukose-induzierter Insulinfreisetzung.

Im Gegensatz dazu standen die Beobachtungen von MATSCHINSKY et al. (14), daß verschiedene Glukosemetaboliten bei Glukose-induzierter Insulinsekretion unverändert bleiben, wohingegen die intrazelluläre Glukosekonzentration der beta-Zellen innerhalb kurzer Zeit sprunghaft anstieg. Es wurde eine enge Korrelation von intra- und extrazellulärem Glukosespiegel gefunden (15, 16). Dies und die Tatsache, daß auch ein nicht metabolisierbarer Zucker (Galaktose) Insulin freisetzen kann (17) - was durch neuere Untersuchungen (18) allerdings wieder in Frage gestellt wurde - , führte zur Aufstellung einer Alternative zur Stoffwechseltheorie der Insulinsekretion, der sogenannten Glukorezeptorhypothese (14): spezifische, wahrscheinlich an der Zellmembran der beta-Zellen lokalisierte Rezeptoren führen danach zur Erkennung des jeweiligen Stimulus und der Weitergabe der Information in das Zellinnere durch diverse Mediatoren. Zu den letzteren gehört wie bei anderen inkretorischen Prozessen vor allem das Kalzium, das parallel zur Glukosestimulation intrazellulär angereichert wird (19). Kalziumantagonisten sind dabei in der Lage, die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung zu hemmen (20, 122). Auf Grund dieser Zusammenhänge kamen LACY und MALAISSE (21, 22, 23) zu der Annahme, daß Kalzium ähnlich der neuromuskulären Erregungsübertragung die Bewegung und "Emiocytose" (LACY) der Insulin enthaltenden Granula im Sinne eines kontraktiven Prozesses mit Hilfe des in der beta-Zelle nachgewiesenen mikrotubulär-mikrofilamentösen Apparates reguliert. Erhärtet wurde diese Hypothese durch Versuche mit Mitosehemmstoffen (21, 24), die durch Schädigung der Mikrofilamente die Insulinfreisetzung nach Glukosestimulation hemmten, sowie durch die Erkenntnis, daß es sich um einen Kalzium-abhängigen Vorgang handelt (24). Dieses Modell wird auch zur Erklärung des von vielen Autoren gefundenen biphasischen Insulinsekretionsmusters herangezogen (25).

Die auffallende Koinzidenz von erhöhter Insulinausschüttung und ebenfalls erhöhter extra- wie intrazellulärer Konzentration von zyklischem AMP bei Versuchen von MONTAGUE (26), BASABE (27) und ZAWALICH (28) rückten diese vielfach als "second messenger" be-

zeichnete Substanz, die bei vielen peripheren Hormonwirkungen als Überträgersubstanz diskutiert wird, neben dem Kalzium in den Mittelpunkt der Frage um den Insulin-Sekretionsmechanismus. Weitere Untersuchungen von SAMS et al. (29) und MONTAGUE (26) sprachen dafür, daß die Aktivität der Phosphodiesterase in den beta-Zellen zumindest bei einigen Stimuli (z.B. Methylxanthinen) via Beeinflussung der c-AMP-Konzentration direkt mit der Regulierung der Insulinsekretion involviert ist. Schon MALAISSE (10) stellte jedoch fest, daß sich der c-AMP-Effekt nur in Anwesenheit einer ausreichenden Konzentration von Glukose im Inkubationsmedium auf die Insulinfreisetzung auswirken kann und vermutete, daß das zyklische 3'5'AMP die Wirkung anderer Stimuli auf die beta-Zelle moduliert. Da die Abwesenheit von Kalzium im Medium die Glukosewirkung auf Insulin- und c-AMP-Sekretion aufhebt (28), erscheinen Kalzium und c-AMP gleich wichtig in ihrer Wirkung auf die Regulation der Insulinsynthese und -sekretion (30).

1.2. Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion der Langerhans'schen Inseln und deren methodische Schwierigkeiten

Die Schwierigkeiten einer gezielten Funktionsuntersuchung der Pankreasinseldellen wird deutlich, wenn man bedenkt, daß bei Säugern der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse nur ungefähr 1 % des Gesamtparenchymgewichts dieses Organs ausmacht (31). Deshalb war man lange Zeit auf Versuche in vivo angewiesen. Diese haben jedoch den Nachteil, daß neben der direkten Beeinflussung der Funktion der beta-Zellen auch eine indirekte Regulation der Insulinsekretion erfolgt, so zum Beispiel über gastrointestinale und neurogene Faktoren. Ferner unterliegt das Insulin bei in vivo-Versuchen der Metabolisierung in der Leber und der Aufnahme in periphere Gewebe, so daß die unmittelbare sekretorische Leistung der Langerhans'schen Inseln nicht registriert werden kann. Teilweise lassen sich die oben aufgeführten Parameter in der vielfach angewendeten Perfusionstechnik ausschalten, bei der das komplette Pankreas mit den umgebenden Organen Milz, Magen und proximales Intestinum entnommen und perfundiert wird (8, 15). Die komplette Ausschaltung möglicher Störfaktoren brachten jedoch erst die Versuche mit isolierten Pankreasinseln. Nachdem wegen ihrer Größe ursprünglich Fischinseln Verwendung fanden (32), gelang es

LACY 1962, isolierte Inseln aus lyophilisiertem Kaninchenpankreas zu gewinnen. Mit frischem überlebendem Material experimentierte 1964 HELLERSTRÖM (33), indem er die Inseln unter dem Mikroskop aus dem exokrinen Gewebe herausschnitt. Zur Gewinnung größerer Mengen von Langerhans'schen Inseln war jedoch erst die von MOSKALEWSKI 1965 (34) erstmals beschriebene Enzymmethode geeignet, bei der das exokrine Pankreas selektiv durch Kollagenase zerstört wird. Dieses Vorgehen wurde auch bei den Versuchen dieser Arbeit gewählt, da auf diese Weise Fragen der hormonellen Beeinflussung der Insulinsekretion am besten erörtert werden können.

Insulinsekretionsstudien mit isolierten Langerhans'schen Inseln können prinzipiell mit zwei verschiedenen Versuchsansätzen durchgeführt werden: Die eine Möglichkeit besteht darin, die isolierten Inseln in einem physiologischen Medium zu inkubieren und das freigesetzte Insulin im Inkubat in bestimmten Zeitintervallen zu bestimmen (10, 13, 15, 23, 26, 41, 64). Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß es sich um ein statisches System handelt, in dem einerseits keine Aussagen über die Sekretionskinetik von Insulin gemacht werden können und andererseits das freigesetzte Insulin möglicherweise im Sinne einer feedback-Inhibierung die weitere Sekretion hemmt oder zumindest moduliert (35). Darüberhinaus ist ein rascher Wechsel des Inkubationsmediums unmöglich. Aufschlußreiche Sequenzstimulierungen (36) können also nicht durchgeführt werden. Diese Nachteile können durch eine Perifusionstechnik vermieden werden, die erstmals von BURR und STAUFFACHER (37) für die Umströmung von Pankreasfragmenten beschrieben wurde und später für Hand-dissezierte Inseln (33) oder Kollagenase-isolierte Inseln weiter entwickelt wurde (21, 38). Letztere Methode wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

1.3. Hormonelle Beeinflussung der Insulinsekretion

Die Wirkung vieler peripherer und hypophysärer Steroid- und Polypeptidhormone auf die Glukosetoleranz und den Serum-Insulinspiegel in vivo sind seit langem bekannt und vielfach untersucht. Bei einer Reihe von Untersuchungen läßt sich jedoch eine unmittelbare Wirkung auf die Pankreasinseln nicht eindeutig von peripheren Insulin-antagonistischen Mechanismen trennen. Eine direkte Hormonwirkung auf

die beta-Zellen ist daher nicht eindeutig erwiesen. Die Klärung einer hormonellen Regulation der Insulinsekretion ist auch insofern interessant, als das Insulin offensichtlich das periphere Hormon ist, für das ein zentraler Kontroll- und feedback-Mechanismus bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. FROHMANN (39) und SZABO et al. (40) gelang es, durch Reizung des ventromedianen Kerns des Hypothalamus von Ratten Veränderungen im Glukosemetabolismus und mittels Insulinapplikation im zentralen Nervensystem über die Arteria carotis eine Beeinflussung des hepatischen Glukosestoffwechsels zu demonstrieren. Diese Befunde führten zur Postulierung eines zentralen Glukorezeptors, der möglicherweise seine Signale im Sinne einer feedback-Regulation über das parasympathische Nervensystem an die Langerhans'schen Inseln vermittelt (40, 126). Da die Hypophyse durch entsprechende Experimente (40) als Ort der zentralen Glukorezeptoren ausgeschlossen werden konnte und folglich eine exakte anatomische Lokalisation sowie eine genaue Charakterisierung des physiologischen Ablaufs der Kontrolle der beta-Zellfunktion noch ausstehen, ist es möglich, daß zusätzlich oder auch primär einem bekannten bzw. noch unbekannten hypothalamischen oder hypophysären Polypeptid eine wichtige Kontrollfunktion zukommt.

Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Insulinsekretion ist vor allem hinsichtlich der neurogenen Regulation der beta-Zelle betrachtet worden. Die Katecholamine hemmen die basale wie auch die durch Glukose stimulierte Insulinausschüttung sowohl in vivo als auch in vitro (38, 41, 42, 43). Dieser Effekt wird offensichtlich durch die alpha-adrenergen Rezeptoren der Pankreasinseln vermittelt, da es bei gleichzeitiger Zugabe des alpha-Blockers Phentolamin zu einer deutlichen Stimulation der Insulinsekretion kommt. Letzteres scheint auf die Wirkung von beta-adrenergen Rezeptoren zurückzuführen zu sein, da deren Blockierung wiederum eine starke Inhibierung der Insulinfreisetzung nach Zugabe von Katecholaminen zur Folge hat (41, 42, 43). Demnach überdeckt der durch die alpha-Rezeptoren vermittelte supprimierende Effekt dieser Stresshormone auf die Funktion der beta-Zelle im Sinne einer Stress-Hyperglykämie die Wirkung der beta-Rezeptoren. Letztere kommt erst zum Ausdruck, wenn Adrenalin wieder basale Serumspiegel erreicht hat und äußert sich in einer Sensibilitäts-

steigerung der beta-Zellen und einer Vermehrung gespeicherten Insulins (31). Diese Erkenntnisse beleuchten die Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die Steuerung der Inseln-funktion, dessen Wirkung durch den Parasympathikus moduliert wird, indem Acetylcholin die Insulinfreisetzung stimuliert.

Die Insulin-antagonistische Wirkung der Glukokortikoide infolge verminderter Glukoseaufnahme, vermehrter Glukoneogenese und Lipolyse sowie verstärkten Eiweißkatabolismus ist bekannt. Adrenalektomierte Tiere entwickeln ähnliche, wenn auch nicht so ausgeprägte Stoffwechselentgleisungen wie hypophysektomierte Tiere, so z.B. eine ungenügende Hyperglykämie nach Glukagon- bzw. Adrenalinapplikation sowie eine starke Insulinempfindlichkeit in Form einer ausgeprägten Hypoglykämie. Adrenalektomie kann im Experiment einen manifesten Diabetes deutlich mildern, andererseits wird eine diabetische Stoffwechsellage durch Cortisolgabe verschlechtert. Eine direkte Wirkung von Cortisol auf das endokrine Pankreas ist in der Literatur nicht erwähnt.

Die Schwangerschaft kann weitgehend als Modellfall für das Zusammen-treffen verschiedener Insulin-antagonistischer Mechanismen angesehen werden. Bei nicht diabetischen Schwangeren muß für die Auf-rechterhaltung einer normalen Glukosetoleranz eine stärkere Insulinsekretion erfolgen und bei manifest diabetischen Schwangeren ist die Glukosetoleranz signifikant herabgesetzt (31). Inwieweit neben dem in der Plazenta produzierten human placental lactogen (hPL) mit Wachstumshormon-ähnlichem Wirkungsprofil (44), den Kortikosteroiden und dem Wachstumshormon auch die Sexualhormone an dieser Stoffwechselverschiebung beteiligt sind, ist schwer zu differenzieren. Eine gewisse Klärung dieser Frage bieten die Untersuchungen an Frauen, die hormonelle Kontrazeptiva einnehmen. Es konnte sowohl nach Einnahme von Mono- als auch von Kombinationspräparaten eine im Ausmaß unterschiedliche Herabsetzung der Insulinsekretion nach oraler Argininbelastung gezeigt werden (45). Dies widerspricht der Beobachtung anderer Autoren, die nach alleiniger Progesteronapplikation eine erhöhte Insulinantwort nach Tolbutamid- und Glukosebelastung angeben (31). Ob diese Versuche eine wie auch immer geartete unmittelbare Beeinflussung der beta-Zelle durch die

Sexualhormone widerspiegeln, muß vorläufig offen bleiben.

Hochdosierte Thyroxin-Gabe bei der durch Teilresektion des Pankreas subdiabetischen Ratte führt zu einem manifesten Diabetes. Die beta-Zellen sind hyperplastisch (31).

An perfundiertem Rattenpankreas konnten LENZEN et al. zeigen, daß nach vorangegangener Thyroxintherapie der Tiere bei einer unveränderten ersten Phase die zweite langsame Phase der Insulinsekretion gehemmt wird (46, 47). Durch gleichzeitige Gabe von Pyruvat konnte dieser inhibierende Effekt aufgehoben werden, was zu der Vermutung führte, daß das Thyroxin die Glykolyse der beta-Zellen beeinflusst (46). Auch beim Menschen wurde eine geringfügig erhöhte Diabetes-Inzidenz bei der Thyreotoxikose festgestellt. Durch Schilddrüsenhormon wird die Glukoseaufnahme im Darm, die Glukoneogenese und die Glykogenolyse in der Leber erhöht, auch die Insulinsekretion ist stimuliert. Ob letzteres allerdings auch auf eine unmittelbare Wirkung von Thyroxin auf die beta-Zelle zurückgeführt werden kann, ist auch wegen der oben geschilderten Tierexperimente eher unwahrscheinlich.

Nachdem Glukagon in der Forschung lange Zeit wenig Beachtung gefunden hatte, wird es mittlerweile als einer der wichtigsten Faktoren bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels angesehen. Da bei vielen Diabetikern der Serum-Glukagonspiegel erhöht und durch eine Steigerung der Glukosekonzentration nicht supprimierbar ist, wird dem Glukagon bei der Entstehung bzw. Verschlechterung eines Diabetes eine wesentliche Rolle zugeschrieben (48, 49, 50). Sowohl pankreatisches als auch das im Intestinum gebildete Enteroglukagon bewirken einen schnellen Anstieg des Serumglukosespiegels durch Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber. Dieser Effekt scheint von einer "permissiven" Wirkung der Glukokortikoide abzuhängen, denn Adrenalektomie vermindert diese Antwort der Leber auf Glukagon (31).

Exogen zugeführtes Glukagon kann beim Menschen schon in kleinsten Dosen die Insulinsekretion stimulieren (51). Auch tierexperimentell konnte ein eindeutig insulinotroper Effekt des Glukagon nachgewiesen werden (27, 41). Inwieweit das endogene Enteroglukagon bzw. pankreatische Glukagon bei der Insulinfreisetzung die physiologisch entscheidende Rolle spielt, ist noch ungeklärt. Zwar wurde ein Anstieg von Enteroglukagon nach oraler Glukosebelastung nachgewiesen, jedoch

ist die zeitliche Korrelation mit dem Anstieg der Insulinkonzentration umstritten. Da die Glukagonsekretion in der Inselzelle durch Glukose gehemmt wird (50), scheint es unwahrscheinlich, daß das in den alpha-Zellen der Langerhans'schen Inseln produzierte Glukagon eine wesentliche Rolle bei der Insulinsekretion nach oral zugeführter Glukose spielt. Allerdings wird die Glukagonfreisetzung durch Aminosäuren, u.a. Arginin, stimuliert (50), so daß es bei der Regulation des intermediären Stoffwechsels nach Eiweißzufuhr von Bedeutung sein könnte.

Die signifikant höhere Insulinsekretion nach oraler Zufuhr von Glukose im Vergleich zur Insulinantwort nach intravenöser Glukoseverabreichung wird in erster Linie auf gastrointestinale und neurohumorale Faktoren zurückgeführt (31). Neben der bereits diskutierten potenzierenden Wirkung des parasympathischen Nervensystems und von Enteroglukagon auf die Insulinsekretion sind wahrscheinlich noch andere intestinale Hormone, wie Gastrin, Sekretin und Cholezystokinin von Bedeutung (31, 52, 53).

Die Ergebnisse über die Wirkung der einzelnen Faktoren ergeben derzeit noch ein sehr widersprüchliches Bild. Pankreozymin-Cholezystokinin führt sowohl bei Versuchen mit isolierten Pankreasinseln als auch mit perfundiertem Pankreas und in vivo zu einer signifikanten Erhöhung der Insulinausschüttung, so daß hier ein von der Funktion des exokrinen Pankreas unabhängiger Effekt vorliegen dürfte (54, 55, 56). Auch Sekretin hat eine deutliche insulinotrope Wirkung (55, 57, 58), die allerdings nach Experimenten von HINZ et al. mit isolierten Pankreasinseln an die Anwesenheit von exokrinem Pankreas gebunden ist und somit eventuell durch entsprechende Mediatoren hervorgerufen wird (56). Noch widersprüchlicher sind die Ergebnisse für Gastrin: HAYES et al. stellten weder bei Patienten mit diversen Funktions-verändernden Magenoperationen (Vagotomie, Gastroenterostomie etc.) noch bei solchen mit Zollinger-Ellison-Syndrom einen gegenüber dem Normalkollektiv veränderten Insulinspiegel nach oraler Glukosebelastung fest (59). Dagegen konnten REHFELD et al. eine durch relativ hohe Dosen von Versuchspersonen intravenös appliziertem Gastrin hervorgerufene Hyperinsulinämie und eine Potenzierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion zeigen (53). Eindeutig sind dagegen die Versuchsergebnisse bezüglich der

Beeinflussung der beta-Zellen durch das gastrin inhibitory polypeptide (GIP), ein die Säureproduktion des Magens hemmender intestinaler Faktor. Alle Autoren bestätigten an Hand von in vitro-Experimenten eine Potenzierung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion bei fehlendem Einfluß auf die basale Insulinfreisetzung durch GIP (60, 61, 62).

Der Einfluß der hypophysären Polypeptide auf die Glukosehomöostase ist durch die Experimente mit hypophysektomierten Tieren (63, 64) sowie Untersuchungen an Akromegalen (65) und Hypophysen-insuffizienten Patienten (66) hinreichend belegt. Im Mittelpunkt steht dabei meist die Insulin-antagonistische Wirkung des Wachstumshormons (hGH), das unter anderem zu einer signifikant erhöhten Diabetes-Inzidenz bei Akromegalen und bei gesunden Patienten zu einer Störung der Glukosetoleranz nach hGH-Applikation führt (67). Die sehr widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Interaktion zwischen hGH und Insulin werden später (s. 4.1.) ausführlich diskutiert. Ferner konnte für ACTH und TSH eine Glukose-abhängige insulinotrope Wirkung festgestellt werden (10, 31). Eine klare Trennung von den durch die jeweiligen peripheren Hormone hervorgerufenen Veränderungen steht bisher noch aus, auch wenn durch Versuche mit adrenaletomierten Ratten nach ACTH-Gabe eine Hypoglykämie bei gleichzeitiger Hyperinsulinämie demonstriert werden konnte, was auf einen direkten Effekt auf die beta-Zelle hindeutet (68).

Ein weiteres Hormon des Hypophysenvorderlappens, das Prolaktin, hat wie das hGH eine Insulin-antagonistische Wirkung. Dies konnte einerseits durch chronische Prolaktin-gaben bei Hunden (69) und andererseits mittels Durchführung einer oralen Glukosetoleranzprüfung bei Patienten mit einem Prolaktinom (70) gezeigt werden. Da eine direkte Beeinflussung der Inselzellfunktion durch Prolaktin bisher nicht demonstriert werden konnte (69, 70), ist die Verschlechterung der Glukosetoleranz durch Prolaktin wohl primär auf die stimulierte Glukoneogenese in der Leber und den lipolytischen Effekt von Prolaktin zurückzuführen.

Die hypothalamischen Hormone Vasopressin (ADH) und Oxytozin sind schon seit langem als Hyperglykämie-erzeugende Faktoren bekannt (71). Da eine Modifizierung der Inselzellfunktion durch ADH mit verschiedenen Methoden nicht demonstriert werden konnte (10, 23,

72), scheint vor allem die wahrscheinlich durch zyklisches AMP vermittelte Glukosefreisetzung aus der Leber für die Erhöhung des Serumglukosespiegels nach ADH-Applikation verantwortlich zu sein (73, 74, 75).

1.4. Zweck dieser Arbeit

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß es auf Grund der vielfältigen Verknüpfungen innerhalb des Intermediärstoffwechsels und der hormonellen Kontrolle dieser Vorgänge schwierig ist, direkte Wirkungen auf die Inselzellen von indirekten Mechanismen via Veränderungen im peripheren Stoffwechsel zu trennen. Die Perifusionsmethode bietet den Vorteil, die störenden Faktoren bei der Untersuchung der Insulinsekretion, die zum Beispiel durch die Freisetzung von Hormonen aus dem Intestinaltrakt und dem exokrinen Pankreas sowie die Funktion des autonomen Nervensystems bedingt sind, weitgehend auszuschalten, um so zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen. Diese sind notwendig, um die bisher widersprüchlichen Resultate über die hormonelle Beeinflussung der Inselzellfunktion zu klären. Es ist Ziel dieser Arbeit, dies anhand der Polypeptide hGH, ADH und Lipotropin zu versuchen und einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, ob diese Hormone eine Rolle bei der physiologischen und pathophysiologischen Modulation der Insulinsekretion spielen könnten. Ferner sollten die durchgeführten Sekretionsstudien durch eine quantitative und qualitative Differenzierung des Reizerfolgs der entsprechenden Substanz weitere Erkenntnisse über den Sekretionsmechanismus von Insulin liefern.

Wachstumshormon wurde für diese Arbeit gewählt, weil mit den Krankheitsbildern der Akromegalie, des Minderwuchses und des Panhypopituitarismus der Klärung der Interaktion zwischen hGH und Insulin eine erhebliche klinische Bedeutung zugemessen werden muß. Die Wirkung von Adiuretin (ADH) auf die Inselzellfunktion interessierte deshalb, weil sowohl bei der Wirkung des ADH besonders an der Niere als auch in Verbindung mit den Überlegungen über mögliche Sekretionsmechanismen des Insulins das zyklische AMP eine zentrale Rolle spielt. Darüber hinaus wurde Lipotropin (aus

Schweinehypophysen isoliertes Peptid B) auf seine Insulinsekretionsstimulierende Bedeutung untersucht, da über die Wirkung dieses erst kürzlich entdeckten hypophysären Faktors lückenhafte und widersprüchliche Ergebnisse vorliegen.

2. METHODIK

2.1. Material

Hochgereinigtes Rinderalbumin war von den Behringwerken, Marburg. Die verwendete Collagenase stammt von der Firma Serva, Heidelberg. Es wurden verschiedene Chargen benutzt (Kat.Nr. 17449), deren Aktivität im Mittel bei 100 PZ-E/g entsprechend ca. 250 Mandl-E/mg lag.

Als Wachstumshormon (hGH) kam Crescormon der Firma Kabi, München, zur Anwendung. Crescormon wurde insgesamt 22 Stunden gegen die von uns verwendete Pufferlösung dialysiert, um niedermolekulare Kontaminationen zu eliminieren. Anschließend wurde die Konzentration von hGH radioimmunologisch bestimmt. Das Lipotropin stammt aus dem Forschungslabor von Dr. P. SCHWANDT im Klinikum Großhadern der Universität München. Es handelt sich um aus Schweinehypophysen isoliertes Peptid B (76, 77). Bei dem verwendeten Adiuretin (ADH) handelt es sich um Arginin-Vasopressin der Firma Ferring, Malmö. Alle übrigen Substanzen waren pro analysi der Firma Merck, Darmstadt.

2.2. Isolation der Langerhans'schen Inseln

Die Isolation von Langerhans'schen Inseln aus dem Rattenpankreas erfolgte nach einer modifizierten Methode von LACY und KOSTIANOVSKY (78). Ziel der Operation war es, die intakten isolierten Inseln ohne exokrine Gewebsanteile in dem später beschriebenen Versuchsaufbau mit verschiedenen Lösungen zu umspülen (= perfundieren).

2.2.1. Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200 - 250 g. Vergleichende Experimente mit schweren (380 g) und leichten (150 g) Tieren zeigten keinen Unterschied in der Insulinantwort (Abb.1). Das Gewicht der Tiere scheint somit keine entscheidende Rolle im Experiment zu spielen, wohl aber waren mittelschwere Ratten leichter zu operieren. Die Tiere wurden mit Altromin^R gefüttert und mußten präoperativ 11 - 16 Stunden fasten

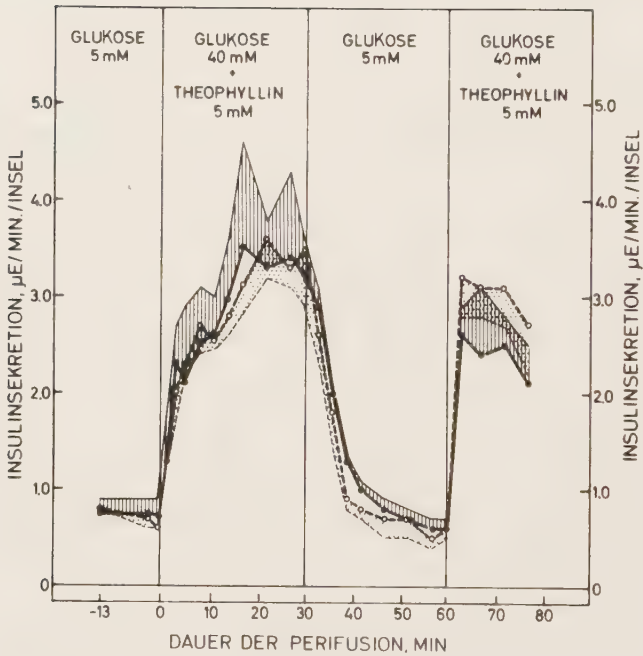


Abb. 1: Perifusion isolierter Pankreasinseln; Vergleich der Insulinsekretion von Langerhans'schen Inseln junger und alter Ratten (n=2);
alte Tiere (380 g) ————
junge Tiere (150 g) - - - - -

2.2.2. Anästhesie und Vorbehandlung

Die Anästhesie erfolgte mit 45 - 50 mg/kg Pentobarbital (Nembutal^R) intraperitoneal. Um eine möglichst große Inselausbeute zu erzielen, wurden die Tiere anfänglich 2 Stunden vor der Operation mit 0,3 ml einer 4 %igen Pilocarpinlösung (i.p.) vorbehandelt (41). Durch seine parasymphathikomimetische Wirkung stimuliert Pilocarpin maximal die Saft- und Enzymsekretion des exokrinen Pankreas. Diese dadurch eliminierten Zymogene würden sonst möglicherweise durch die folgende Kollagenaseverdauung freigesetzt und aktiviert und besonders die proteolytischen Bestandteile könnten dabei die Membranstrukturen der Inseln zerstören. Dementsprechend ergibt sich

bei Pilocarpinvorbehandlung eine wesentlich größere Inselausbeute. Diese Behandlung hat jedoch zwei Nachteile: Erstens verwendete KUO (41) die Pilocarpin-Injektionen zur Inselisolierung nur bei Inkubationsstudien zur Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität, nicht aber bei Insulinsekretionsstudien, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Pilocarpin die Insulinsekretion beeinflußt (41) und dadurch die beta-Zellen zumindest partiell degranuliert. Zum zweiten wurde Pilocarpin, besonders im Zusammenhang mit Nembutal^R, von den Ratten sehr schlecht vertragen. Die Tiere antworteten extrem vagoton und starben gelegentlich an cerebralen Krämpfen oder Herzstillstand. Da auch eine niedrigere Pilocarpinkonzentration (1 %) die gleiche Wirkung zeigte, war diese Vorbehandlung für unsere Experimente ungeeignet.

2.2.3. Operation

Nach der Anästhesie mit Nembutal^R wurde der Bauchraum durch einen Mittelschnitt und zwei Querschnitte breit eröffnet. Die Leber wurde nach oben geschoben und der dann sichtbare Ductus choledochus knapp unterhalb der Vereinigung der Dd. hepatici abgebunden. Nach Aufsuchen der Mündung des Gallenganges in den Darm wurden etwa 7 ml der unten beschriebenen Pufferlösung durch eine Kanüle mit Kaliber 20 eingespritzt, wobei das vorherige Abbinden des Ductus choledochus einen Reflux in die intrahepatischen Gallenwege verhinderte. Dieser Teil der Operation erfolgte unter dem Mikroskop bei siebenfacher Vergrößerung. Das Abbinden des Darmes beidseits der Papille, um auch dort einen Reflux zu vermeiden, erwies sich als unnötiger Zeitaufwand. Zur Injektion wurde derselbe Puffer verwendet wie zur Perifusion, nämlich Krebs-Henseleit-Puffer (s. 2.4.), während in der Literatur (78) Hanks-Lösung benutzt wird. Vergleichende Experimente von uns erbrachten keinen Unterschied (Abb.2). Die Zusammensetzung der beiden Pufferlösungen ist in Tabelle 1 gegenübergestellt.

Da bei der Ratte die zwei großen Pankreasausführungsgänge direkt in den Gallengang münden (78), bläht sich das Organ bei richtiger Lage der Nadel weit auf, wobei es vor allem zur Desintegration des exokrinen Parenchyms kommt. Um eine Schädigung der Inseln, z.B.

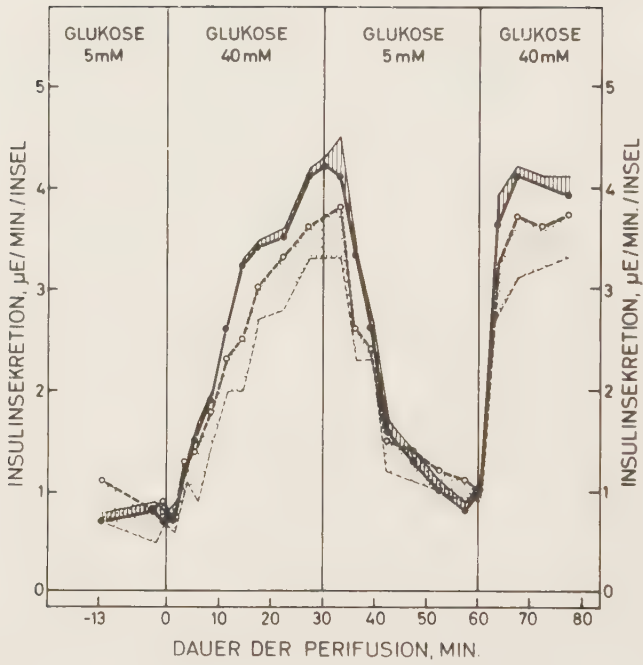


Abb. 2: Perifusion isolierter Pankreasinseln mit verschiedenen Pufferlösungen (n=2); Krebs-Henseleit-Puffer —, Hanks-Puffer - - -.

Tab. 1: Zusammensetzung der verschiedenen Perifusionslösungen.

	Krebs Henseleit- Puffer	Hanks-Puffer
NaCl	120.0	140.0
KCl	4.7	5.4
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2.5	1.3
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.2	0.8
NaHPO ₄	-	0.3
KH ₂ PO ₄	1.5	0.4
NaHCO ₃	20.0	n.B. bis pH 7,4

dazu jeweils 1 g% Albumin, 1000 KIE/ml Trasylol, Testsubstanzen.

durch Hypoxie, zu vermeiden, erfolgten die nachfolgenden Schritte zur Inselisolierung möglichst rasch und mit Ausnahme der Collagenase-verdauung bei 0° bis + 4° C. Das Pankreas wurde exzidiert, ohne große Gefäße oder den Darm zu verletzen, und in eine eisgekühlte Petrischale mit Krebs-Henseleit-Puffer gelegt.

2.2.4. Weiterverarbeitung und Collagenaseverdauung

Das Pankreas wurde unter dem Mikroskop bei siebenfachen Vergrößerung von Fett und Blutkoageln befreit und mit der Schere möglichst klein geschnitten.

Zur Collagenaseverdauung wurde anfänglich die von LACY et al. (78) beschriebene Methode benutzt: 6 mg Collagenase pro ml Pankreas-gewebe und kräftiges Schütteln des Gemisches mit der Hand im Wasser-

bad für 8 - 10 Minuten. Die Schüttelkraft und -frequenz war individuell verschieden und die Inselausbeute bzw. die Güte der Isolierung variierte erheblich. Entweder waren die Inseln schon stark angedaut oder aber sie waren noch nicht vollständig vom umgebenden exokrinen Pankreas getrennt. Ein automatischer Schüttler konnte nicht verwendet werden, da seine Kippbewegung nicht ausreichte, um die geringe Gewebsmenge richtig durchzuschütteln. Neben der Bedeutung der mechanischen Behandlung des Gewebes war die Auswahl der Collagenase extrem wichtig. Mit der anfangs von WORTHINGTON gelieferten, speziell zur Inselisolierung empfohlenen Collagenase (Nr.4186) war es nicht möglich, eine einwandfreie Trennung von Inseln und exokrinem Gewebe zu erreichen, da nach der angegebenen Schüttelzeit (78) noch grobe Gewebstücke, wenig später nur vollständig verdautes Pankreas-Gewebe vorhanden war. Der Zeitpunkt, zu dem - wie erwartet - intakte Inseln in sonst verdauter Umgebung liegen sollten, ließ sich trotz wiederholter Experimente nicht feststellen. Kinetische Vergleichsstudien von zwei Chargen mit Probenentnahmen nach 6, 9 und 12 Minuten zeigten zwar Unterschiede im Verdauungsgrad des Pankreas, eine zufriedenstellende Inselisolierung konnte jedoch nicht erreicht werden. Es zeigte sich, daß bei längerer Lagerung der Collagenase die Enzymaktivität stark abnahm und daß verschiedene Enzymchargen der gleichen Firma unterschiedlich wirkten. Somit war es nötig, jede Lieferung neu auszutesten. Erst die Collagenase der Firma Serva, lyophil reinst (s.2.1.), erbrachte regelmäßig eine gute Gewebsverdauung, so daß eine Standardmethode entwickelt werden konnte: Pro Bauchspeicheldrüse wurden 10 mg Collagenase in 1 - 2 ml Puffer gelöst und mit dem kleingeschnittenen Pankreas in ein Plastikgefäß gefüllt. Um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen, wurde ein Magnetrührer verwendet, auf dem ein temperaturgeregeltes Wasserbad befestigt war. Das Gemisch wurde bei 37° C 5 Minuten mit 700 U/min und 10 Minuten mit 250 U/min geschüttelt. Danach wurde die Lösung wieder in das Plastikröhrchen gefüllt, in dem vorher die Collagenase gelöst worden war, mit Puffer aufgefüllt und kräftig durch eine Plastikspritze (10 ml) gezogen. Nach fünf Minuten wurde der Überstand abgesaugt und erneut Puffer eingespritzt. Dieser Vorgang wiederholte sich nach

4, 7 und 9 Minuten. Nach dem Abziehen des letzten Überstandes wurde das restliche Gewebsgemisch eisgekühlt und tropfenweise in eine ebenfalls eisgekühlte Petrischale gegeben und bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Gegen einen schwarzen Hintergrund zeigen sich die Inseln als kleine weiße, rundlich-ovale, kompakte Gebilde mit einem Durchmesser von etwa 50 μ . Mit einer Mikropipette wurden die Inseln zuerst in ein anderes Schälchen gebracht, um sie möglichst von restlichen exokrinen Gewebsteilen zu trennen und anschließend wurden sie auf die mit Puffer angefeuchteten Filter gelegt.

Die Filtergehäuse wurden zugeschraubt, mit Kontrollpuffer aufgefüllt und in das Perifusionssystem eingebaut. Die Inselanzahl betrug etwa 150 pro Pankreas. Jede Perifusionskammer wurde mit 10-20 Inseln beladen. Durch die gleichzeitige Operation von zwei Ratten erhöhte sich die gewonnene Inselzahl, die nötige Menge konnte schneller gesammelt und auf die Filter gebracht werden. Damit verkürzte sich die Zeit von der Operation bis zum Beginn der Perifusion auf etwa 90 Minuten.

2.3. Versuchsaufbau und Durchführung der Perifusion

2.3.1. Versuchsaufbau

Der für die Perifusion verwendete Versuchsaufbau besteht aus einem Vorratsgefäß für die Pufferlösung (Perifusionslösung), einem Oxygenator, einem Umschaltventil, einem Thermostaten mit Wasserbad und Glasspirale sowie einer Perifusionskammer, einer Pumpe und einem Sammelgefäß. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt die Abbildung 3. Das Vorratsgefäß enthält die jeweils benötigte Perifusionslösung, die mittels PVC-Schlauch dem Oxygenator zugeführt wird. Der Schalter, ein Schiebeventil mit Teflonauskleidung, ermöglicht einen raschen und problemlosen Wechsel von einer Perifusionslösung zur folgenden. Die Glasspirale und die Perifusionskammer befinden sich im Wasserbad, das mittels einer thermostatisch regulierten Umwälzpumpe konstant auf 37° C gehalten wird. Daran schließt sich die Schlauchpumpe der Firma Ismatec an, die die Perifusionslösung mit konstanter Geschwindigkeit durch das System befördert. Nach der Pumpe wird das Perifusat in einem Sammelgefäß aufgefangen. Zu bestimmten Zeiten werden Proben zur Bestimmung von Insulin abgenommen.

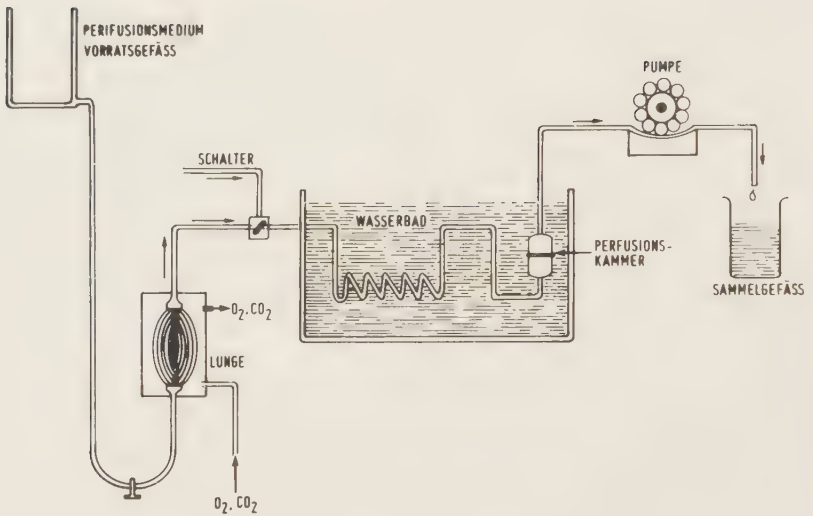


Abb. 3: Schematische Darstellung und Abbildung des Versuchsaufbaus (Erläuterungen siehe Text).

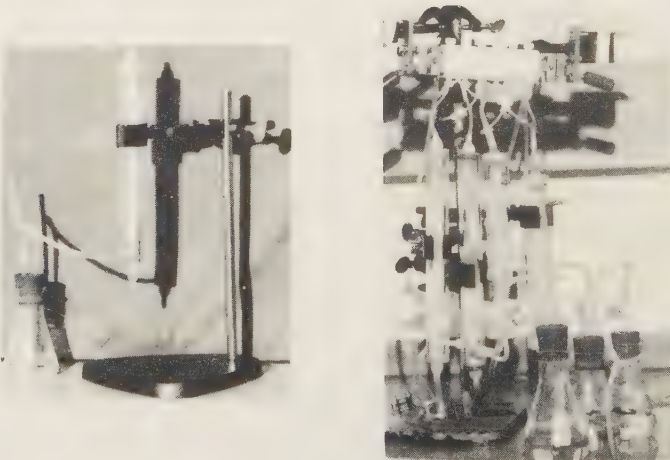


Abb. 4: Siliconlunge zur Oxygenierung der Perifusionslösungen (aus dem Entwicklungslabor Dr. Marx, Firma Fresenius, München)

2.3.2. Experimentelles Vorgehen bei der Perifusion

Um eine Optimierung der Versuchsergebnisse zu erreichen, war es notwendig, durch verschiedene Vorversuche mehrere Teile des Versuchsaufbaus zu testen und zu verbessern.

2.3.2.1. Oxygenierung der Perifusionslösung und Konstanthaltung des pH

Der Oxygenator hat die Aufgabe, den zur Perifusion verwendeten Puffer (Perifusionslösung) mit Sauerstoff und Kohlendioxyd zu sättigen und den pH-Wert möglichst konstant im physiologischen Bereich für die gesamte Dauer des Versuchs zu halten. Ursprünglich wurden sogenannte Glaslungen verwendet, an deren Innenwand der Puffer als dünner Flüssigkeitsfilm herunterfließt und mit seiner so vergrößerten Oberfläche mit dem zugeführten $O_2 : CO_2$ -Gemisch im Gegenstrom in Kontakt war. Wegen technischer Schwierigkeiten und unbefriedigender Meßwerte sind wir zu sogenannten Siliconlungen übergegangen. Diese bestehen aus ca. 100 Siliconschläuchen mit einem Durchmesser von je 0,2 mm, durch die die Perifusionslösung auf Grund hydrostatischer Kräfte von unten nach oben fließt. Das Schlauchbündel ist in einem Plexiglaszylinder eingeschlossen, in welchem eine Zuleitung und eine Ableitung für das zur Oxygenierung notwendige $O_2 : CO_2$ -Gemisch (95 : 5) angebracht sind (Spezialanfertigung des Entwicklungslabors Dr. Marx, Firma Fresenius, München). Das poröse Silicon ermöglicht einen optimalen Gasaustausch zwischen Puffermedium und dem die Schläuche allseits umgebenden Gasgemisch, ohne daß der Puffer aus den Schläuchen austreten kann (Abb.4). Auf diese Weise gelang es uns, die Werte für die O_2 und CO_2 -Partialdrucke und den pH-Wert zu optimieren (Tab.2). Die gefundenen Partialdrucke für O_2 und CO_2 stimmen mit den Daten von IDAHL (79) und LACY (80) überein.

Tab. 2: O_2 - CO_2 - Partialdrucke und pH der Perifusionslösungen nach der Oxygenierung in der Siliconlunge (in Klammern Vergleichswerte Glaslunge)

	P_{O_2}	P_{CO_2}	pH
Nach der Lunge	419 (240)	37,2 (26)	7,34 (7,5)
Vor dem Filter	386 (131)	35,4 (24)	7,35 (7,6)

2.3.2.2. Umschaltventil

Die von uns durchgeführten Sekretionsstudien verlangen während des Versuchs einen mehrmaligen Wechsel der die Pankreasinseln umfließenden Pufferlösungen. Dazu dient die Schaltervorrichtung, die in der Versuchsanordnung zwischen Oxygenator und Wasserbad eingebaut ist. Die von uns anfangs eingesetzten Dreiwegehähne hatten den Nachteil, daß durch das notwendige Schlauchsystem der Totraum des Systems sehr groß wurde. Zudem entstanden durch Betätigung des Dreiwegehahns kleine Druckschwankungen und Turbulenzen, die wiederum erhebliche Auswirkungen auf die Sekretionsrate der nachgeschalteten Pankreasinseln hatten. IDAHL (79) beschreibt z.B. eine signifikante Erhöhung der Insulinausschüttung durch Druckunterschiede, die nach einer Verzögerung der Schalterumstellung um nur eine Sekunde entstehen. Die von verschiedenen Autoren (13, 81) gefundene sofort eintretende, kurzzeitige Stimulation der Insulinsekretion nach Erhöhung der Glukosekonzentration in der Perifusionslösung dürfte zumindest teilweise seine Erklärung in den plötzlichen Druckdifferenzen bei der Umschaltung finden. Um solche störenden Artefakte zu vermeiden, wurden statt der Dreiwegehähne Schiebeventile (Abb.5) mit Teflonausschichtung verwendet, die einen Totraum von ca. 5 μ l aufweisen (Umschaltventile der Fa. Ismatec, wobei 6 Ventile mechanisch gekoppelt wurden). Der Wechsel von einem Medium auf das andere konnte hiermit innerhalb von Sekundenbruchteilen erfolgen, Auswirkungen auf die

Insulinsekretionsrate wurden mit diesem Schalter nicht beobachtet (Abb.10). Mit den Schiebeventilen gelang es ferner, den

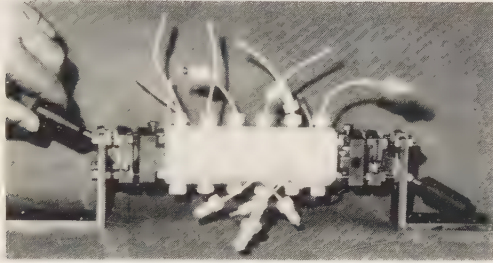


Abb. 5: Schiebeventile zur Umschaltung auf die verschiedenen Perifusionslösungen.

Totraum des gesamten Systems nach der Schaltervorrichtung stark zu reduzieren. Wie ein Versuch mit einer mit J^{125} -Insulin markierten Perifusionslösung zeigt (Abb.6), ist bereits 2 - 3 Minuten nach der Betätigung des Schiebeventils im Sammelgefäß ein Anstieg der Radioaktivität zu verzeichnen, was einem Totraum zwischen Ventil und Insel von ca. 1 ml entspricht. Ein Plateau konstanter Maximalwerte ist nach ungefähr 5 - 6 Minuten erreicht. Diese Werte stimmen in etwa mit den Bedingungen bei anderen Autoren überein (21).

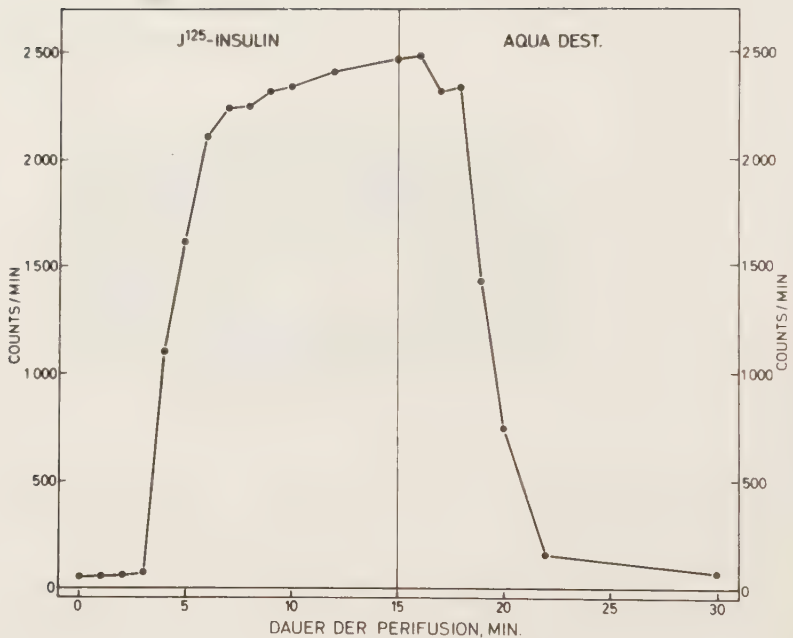


Abb. 6: Perifusion mit einer J¹²⁵-Insulin markierten Lösung zur Totraumbestimmung (n=4).

2.3.2.3. Perifusion der Pankreasinseln

Die Perifusionslösung wird durch die Glasspirale im Wasserbad auf 37° C erwärmt und anschließend der Perifusionskammer zugeführt. Bei dieser handelt es sich um ein Plastik-Filtergehäuse der Firma Millipore (Kat.Nr. SX 0001300) mit einem Volumen von ca. 5 ml (Abb.7). In der Mitte der Kammer befindet sich eine Fassung (Plastikfritte) für den Plastikfilter mit einer Porenweite von 1,2 µm. Diese dient zur Fixierung des Filterpapiers, auf dem die Pankreasinseln aufgelegt werden. Die Auswahl des geeigneten Filterpapiers bereitete Schwierigkeiten, da sowohl eine Verminderung des Durchflusses durch zu kleine Poren zu vermeiden war, als auch bei zu großer Porenweite ein Durchrutschen der

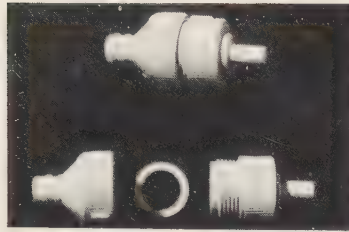


Abb. 7: Plastik-Filterhalter der Firma Millipore, verwendet als Perifusionskammer.

Pankreasinseln befürchtet werden mußte. Ein weiteres Problem stellte die mögliche Insulinbindung durch den Filter dar, was eine erhebliche Verfälschung der Sekretionsraten zur Folge gehabt hätte. Durch Versuche mit J^{125} -markiertem Insulin und anschließender Aktivitätsmessung des Filterpapiers konnte eine Insulinbindung überprüft und ausgeschlossen werden. Eine deutliche pH-Verschiebung unter dem Einfluß verschiedener Filter (IDAH, persönliche Mitteilung) wurde durch entsprechende Messungen ebenfalls ausgeschlossen. Nachdem verschiedene Filterpapiere hinsichtlich dieser zu erfüllenden Kriterien erprobt worden waren, wurden Duralonfilter (Firma Millipore, Kat. Nr. NCWPO 1300) mit einer Porenweite von 14μ verwendet.

Nach dem Aufbringen der Inseln (2.2.4.) werden die Perifusionskammern verschlossen und mit Pufferlösung aufgefüllt und anschließend in das System eingefügt.

Von großer Bedeutung für den gesamten experimentellen Ablauf ist die Perifusionsgeschwindigkeit, die durch die Schlauchpumpe am Ende des Systems reguliert wird. Die Position der Pumpe im Experiment hatte sich als die günstigste bezüglich gleichbleibender Strömungsverhältnisse herausgestellt. Zur Untersuchung verschiedener Stimuli auf die Insulinsekretionsrate ist der konstante Flow eine wichtige Voraussetzung, da, wie bereits erwähnt (s.2.3.2.2.) schon geringe Druckschwankungen erhebliche Auswirkungen auf die Sekretionsrate der beta-Zellen haben können. Ferner wurde von

MITSURU HOSHI (38) gezeigt, daß verschiedene Perifusionsgeschwindigkeiten eine signifikant unterschiedliche Sekretionsrate des Insulins bei sonst gleichbleibenden Verhältnissen bedingen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Ergebnissen bei der Perfusion, wo verschiedene Durchflußgeschwindigkeiten zu keinen Änderungen der Insulinfreisetzung führten (15). Abhängig von der Zahl der perifundierten Inseln und der Größe der Perifusionskammern werden in der Literatur Perifusionsgeschwindigkeiten zwischen 150 μ l/min (79) und 1 ml/min (28) angegeben. Nach mehreren Vorversuchen wurde für diese Arbeit eine Perifusionsgeschwindigkeit von 0,4 - 0,5 ml/min gewählt.

2.3.2.4. Experimentelle Durchführung der Perifusion

Das gesamte System wird vor Beginn des Versuchs mit Kontroll-Perifusionslösung gefüllt (s. 2.4.). Nach Einbau der mit Inseln gefüllten Perifusionskammern (s.o.) wird in der Regel über 50 min eine Kontrollperifusion mit 5 mM Glukose-Pufferlösung durchgeführt. Dies erfolgte zur Adaption der Pankreasinseln an die Versuchsbedingungen, da sich die Traumatisierung der Inseln während der Isolation aus dem Pankreasgewebe zu Beginn der Perifusion meist durch eine massiv gesteigerte Insulinausschüttung äußert. Nach ca. 30 - 40-minütiger Perifusion ist ein steady state, d.h. eine gleichbleibende Basalsekretionsrate erreicht (Abb.8). Während dieser Phase werden drei Proben als Kontrolle der basalen Insulinsekretion entnommen. In der 50. Minute wird dann durch Betätigung des Schiebeventils die zu testende Substanz den Pankreasinseln zugeführt. Nach dem Umschalten wird zunächst über 8 Minuten in 2-minütigem, dann 12 Minuten lang in 3-minütigem und später in 5-minütigem Abstand Perifusat jeweils 45 Sekunden lang gesammelt. Der weitere Ablauf richtet sich nach der jeweiligen Fragestellung (s.3.1.1.). Insgesamt dauerte ein Experiment 110 - 130 Minuten und bei 6 Perifusionskammern wurden 102 - 162 Proben gewonnen.

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der gewonnenen Langerhans'schen Inseln werden in der Regel parallel zu den zu testenden Substanzen jeweils zwei Perifusionskammern mit 40 mM Glukoselösung stimuliert. Auf diese Weise kann die Ansprechbarkeit

der beta-Zellen auf eine erhöhte Glukosekonzentration im Perifusionsmedium kontrolliert und so die Aussagekraft verschiedener Versuche miteinander verglichen werden. Dadurch werden auch Artefakte auf Grund von Druckschwankungen oder anderer exogener Einflüsse ausgeschlossen, die anderenfalls bei diesem äußerst sensiblen System leicht zu Fehlinterpretationen hätten Anlaß geben können. Dieses echte interne Kontrollsystem ist weder bei der Perfusion noch bei Versuchen in vivo durchführbar und stellt das Perifusionssystem als echte Bereicherung zur Erforschung von Sekretionsmechanismen dar. Pro Filter werden 10 - 20 Inseln verwendet, die Versuchsergebnisse wurden als Insulinsekretionsrate pro Insel berechnet.

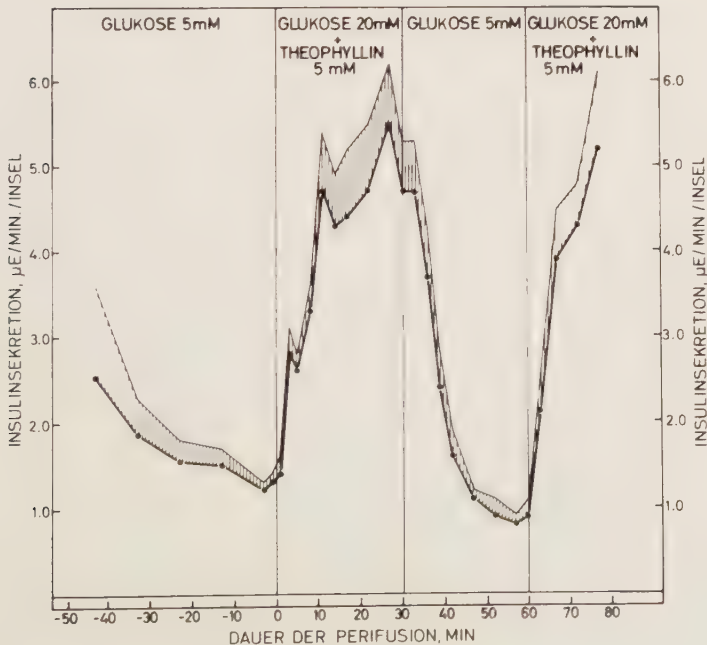


Abb. 8: Sequenzstimulation mit 20 mM Glukose und 5 mM Theophyllin (n=6).

2.4. Zusammensetzung der Perifusionslösungen

Die Perifusionslösungen bestehen aus einem artefiziellen Medium mit 1 g% Rinderalbumin und Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer in folgender Zusammensetzung (in mM) :

Tab. 3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers.

NaCl	120,0
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	20,0
KH ₂ PO ₄	1,5

Das Rinderalbumin dient zur Verhinderung von Wandabsorption des Insulins an Glas und Kunststoff und zur Stabilisierung von Insulin im Perifusat.

Ein Teil des Puffers, ohne NaHCO₃ und KH₂PO₄, wurde vor Verwendung ca. eine Stunde lang mit einem O₂-CO₂-Gemisch (95:5) begast.

Ferner enthält der Puffer Trasylol in einer Konzentration von 1000 KIE/ml zur Inhibierung eventuell freigesetzter Proteasen aus exokrinen Gewebsanteilen.

Diesem Perifusionsmedium wurde Glukose sowie Wachstumshormon (hGH), Lipotropin und Vasopressin (ADH) in den angegebenen Konzentrationen zugefügt. Das Kontrollmedium enthielt 5 mM Glukose. Die Lösungen wurden vor dem Beginn des Experiments mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 7,4 eingestellt und durch Begasung mit einem O₂-CO₂-Gemisch (95:5) während des Versuchs konstant gehalten (s. 2.3.2.1.).

2.5. Insulin-Radioimmunoassay

Die Insulinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip der von HALES und RANDLE beschriebenen Doppelantikörpermethode (82). Der Insulin-Kit stammte von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig. Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Insulin wurde eine semiautomatische Filtrationsmethode benutzt (83). Die

Radioaktivität des gebundenen Tracers wurde mit einem Gamma-Guard, Firma Tracerlab, Köln, gemessen, wobei die Zählausbeute für ^{125}Jod 75% betrug. Zur Errechnung der Insulinkonzentration dienten Eichkurven mit Humaninsulin als Standard, da der Vergleich mit hochgereinigtem Ratteninsulin nur quantitative Unterschiede im Sekretionsprofil zeigte (15). Die Berechnung der Humaninsulinäquivalente erfolgte mit Hilfe der Splineapproximation unter Verwendung des Siemens Computers Typ 404/3 (84).

In Abwandlung der dem Kit von Amersham Buchler beiliegenden Vorschriften zur Insulinbestimmung, die nur für die Bestimmung von Seruminsulin gelten, setzten wir unsere Standards in der jeweils verwendeten Perifusionslösung an. Alle in den Lösungen verwendeten Substanzen einschließlich hGH, Lipotropin und ADH, hatten keinen Einfluß auf den Radioimmunoassay, was durch Zusatz der entsprechenden Peptide zur Insulin-Standardkurve ausgeschlossen werden konnte.

2.6. Stabilität der Testhormone während der Perifusion

Zur Überprüfung, ob während der Perifusion die Testhormone (hGH, ADH und Lipotropin) durch Adhäsion oder Abbau verschwinden und damit die gewünschte Hormonkonzentration die Inseln nicht erreicht, wurden während der Experimente an verschiedenen Stellen des Versuchsaufbaus Proben zum Hormonnachweis entnommen. Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmungen. Der Hormonverlust betrug danach maximal 30 %.

Tab. 4: Hormonnachweis in der Perifusionslösung.

	Vor dem Versuch	Vor der Inkubationskammer	Nach der Inkubationskammer	Im Auffanggefäß
hGH 1000 ng/ml	936	704	616	704
hGH 100 ng/ml	111	104	88	76
ADH 100 ng/ml	89	78	72	76
Lipotropin 1000 ng/ml	980	976	890	862

2.7. Ablauf der Experimente und
 Auswertung der Ergebnisse

2.7.1. Ablauf der Experimente

2.7.1.1. Untersuchung des Einflusses der Testhormone
 auf die basale Insulinsekretion

Nach der üblichen Präperifusion mit 5 mM Glukose über 50 Minuten wurde umgeschaltet auf ein Perifusat, das zusätzlich zur Glukose (5 mM) das zu testende Polypeptid in verschiedenen Konzentrationen enthielt. In dieser 30 Minuten dauernden Phase sollte ein eventueller Stimulationseffekt auf die basale Insulinsekretion gezeigt werden. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Perifusion ohne Hormon, jedoch mit 5 mM Glukose. Danach wurde erneut 30 Minuten lang das Hormon getestet. Als Kontrolle diente eine Perifusion mit 5 bzw. 40 mM Glukose in den entsprechenden Zeitintervallen.

2.7.1.2. Untersuchung der Wirkung der Testhormone
 auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Durch diese Experimente sollte ein eventuell bestehender suppressierender oder additiv bzw. potenzierend stimulierender Effekt von hGH, Lipotropin und ADH auf die durch Glukose stimulierte Insulinsekretion untersucht werden. In der ersten Phase nach 50-minütiger Präperifusion mit 5 mM Glukose wurde daher über 30 Minuten mit 40 mM Glukose stimuliert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Perifusion mit dem zu testenden Hormon plus 40 mM Glukose. In der letzten Phase (60. - 80. Minute) wurde wieder mit 40 mM Glukose allein perifundiert. Zum Zwecke der Kontrolle und des Vergleichs erfolgte parallel dazu eine kontinuierliche Stimulation mit 40 mM Glukose über die gesamte Dauer des Experiments.

2.7.1.3. Untersuchung der Wirkung einer Präperifusion
 der Testhormone auf die nachfolgende Glukose-
 induzierte Insulinsekretion

Sechzig Minuten lang wurde mit 5 mM Glukose plus dem zu testenden Hormon präperifundiert. Anschließend wurde 50 Minuten lang mit 40 mM Glukose allein oder mit Glukose (40 mM) plus Hormon stimuliert. Diese Sequenzexperimente sollten Aufschluß geben,

ob die zu testenden Hormone einen akuten, nach Elimination des Hormons rasch reversiblen Effekt haben oder zu einer länger anhaltenden Veränderung der beta-Zelle führen. Als Kontrolle diente eine Präperifusion mit 5 mM Glukose mit anschließender Stimulation (40 mM Glukose) in der gleichen zeitlichen Sequenz.

2.7.2. Auswertung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert der Insulinsekretion in Mikroeinheiten pro Minute pro Pankreasinsel berechnet. Gleichzeitig wurde der Standard error errechnet. In der Zeitachse (Abszisse) wurde der Beginn des Experiments nach erfolgter Präperifusion über 50 bzw. 60 Minuten mit Minute Null gekennzeichnet, wobei die Zeitverschiebung von 3 Minuten auf Grund des gemessenen Totraums des Systems berücksichtigt wurde.

3.

ERGEBNISSE

3.1. Glukose-induzierte Insulinsekretion

Wie bereits unter 2.3.2.4. dargestellt, wurde vor Beginn des eigentlichen Experiments eine längere Präperifusion mit 5 mM Glukose durchgeführt. Dieses Vorgehen war notwendig, da unmittelbar nach Beginn der Perifusion infolge der Traumatisierung der Inseln durch die Collagenase-Isolierung hohe Insulinkonzentrationen gemessen wurden. Erst nach einer Latenzzeit von ca. 30 - 40 Minuten war eine stabile niedrige basale Insulinsekretion erreicht (Abb.8), ein Befund, der auch von IDAHL (79) beschrieben wurde.

Als Bezugssystem zur Beurteilung der Wirkung der untersuchten Hormone auf die Insulinsekretion und zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Langerhans'schen Inseln diente eine bei jedem Experiment durchgeführte Stimulation der Insulinsekretion mit 40 mM Glukose. Diese Glukosekonzentration hatte sich bei Vorversuchen als optimaler Stimulus für die Insulinsekretion der Collagenase-isolierten Pankreasinseln erwiesen. Dauer und Sequenz der Kontrollstimulation mit Glukose richtete sich nach dem jeweils durchgeführten Experiment.

Abbildung 9 zeigt die durch 40 mM Glukose induzierte Insulinsekretionskinetik. Man sieht in Übereinstimmung mit anderen Autoren (21, 38, 79, 80, 85) eine prompte Sekretionsantwort nach Umschalten auf das Stimulationsperifusat mit 40 mM Glukose. Die Umschaltung der Perifusion auf 5 mM Glukose führt zu einem raschen Absinken der Sekretion, prästimulatorische Sekretionsraten werden ca. 20 Minuten nach Unterbrechung der Stimulation erreicht.

Nach Erreichen der Basalsekretion führt die erneute Stimulation mit 40 mM Glukose gegenüber der ersten Stimulation zu einer rascheren und etwas höheren Insulinfreisetzung. Dieses Phänomen - auch als "priming" bezeichnet - kann auf eine Sensibilitätssteigerung der Pankreasinseln durch die vorausgegangene Stimulation zurückgeführt werden. Dieser "priming"-Effekt findet sich auch bei anderen Autoren (15, 86).

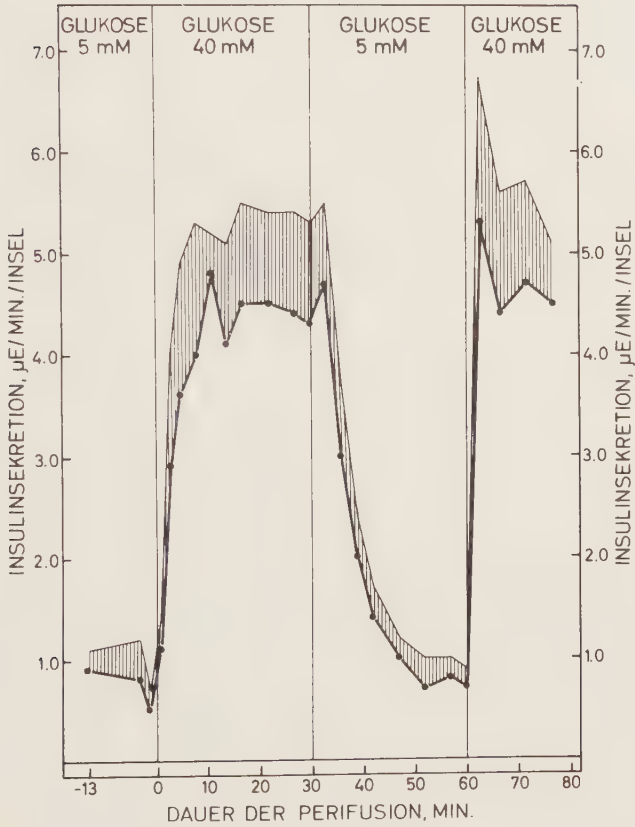


Abb. 9: Sequenzstimulation mit 40 mM Glukose (n=8).

Ein typisches biphasisches Sekretionsmuster, das man bei der Glukose-stimulierten Insulinfreisetzung im Perfusionsexperiment findet (14, 24, 27, 36, 46, 47), konnte bei uns nicht beobachtet werden. Ob die fehlende Biphasizität, wie sie auch von einzelnen Arbeitsgruppen für die Perifusion Collagenase-isolierter Inseln beschrieben wird (21, 28, 38, 80, 81), mit unserer Isolier-technik oder mit der verwendeten hohen Glukosekonzentration im Zusammenhang steht, kann nicht endgültig entschieden werden. Eine hohe Glukosekonzentration führt zumindest im Perfusions-experiment zu einer Aufhebung der Biphasizität der Insulinsekretion (14). Allerdings zeigten sich bei uns auch bei der Stimulation mit niedrigen Glukosekonzentrationen (10 und 20 mM) keine typischen biphasischen Sekretionsmuster (nicht gezeigt).

Wenn 20 mM Glukose gemeinsam mit Theophyllin (5 mM) perifundiert wurden, so kam es neben der bekannten Potenzierung der Glukose-stimulierten Insulinfreisetzung (26, 29, 87) auch zu einer angedeuteten biphasischen Sekretion (Abb.8), möglicherweise als Hinweis für eine Änderung der Ansprechbarkeit der beta-Zelle nach der vorausgegangenen Collagenase-Behandlung. Die Restitution der Biphasizität der Glukose-induzierten Insulinausschüttung unter Theophyllin wurde auch für andere Systeme (Perfusion) beschrieben (27, 124).

Eine Perifusion mit 40 mM Glukose über einen Zeitraum, über den auch bei allen nachfolgenden Sequenzexperimenten (s.u.) gemessen wurde, führte zu einer monophasischen Sekretion, wobei ein gleichbleibendes Sekretionsniveau nach etwa 30 Minuten erreicht war (Abb. 10). Eine zweimalige Umschaltung (30. und 60. Minute) ohne Änderung der Glukosekonzentration blieb ohne signifikanten Einfluß auf die Sekretionskinetik.

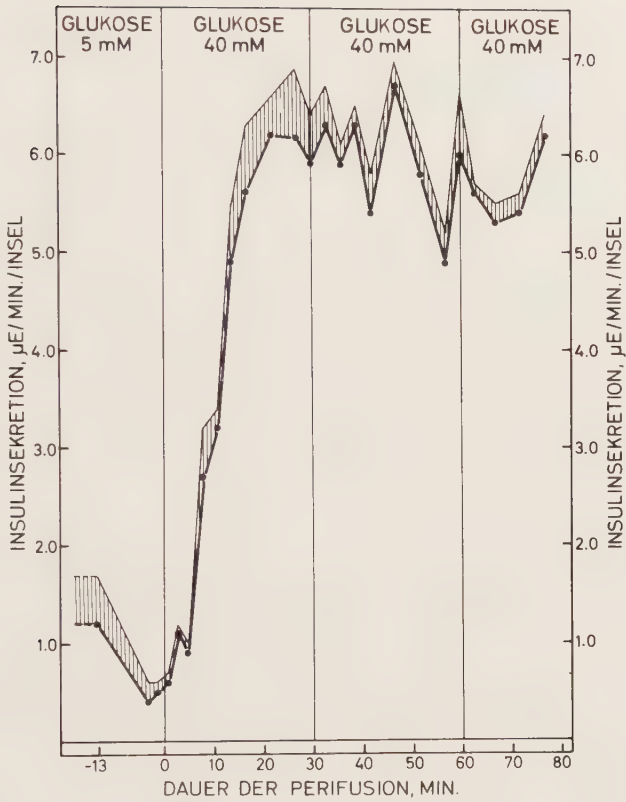


Abb. 10: Stimulation mit 40 mM Glukose über 80 Minuten (n=6).

3.2. Einfluß von Wachstumshormon (hGH)
auf die Insulinsekretion

3.2.1. Einfluß von Wachstumshormon
auf die basale Insulinsekretion

Zunächst sollte der Effekt von hGH auf die basale Insulinausschüttung der Pankreasinseln untersucht werden. Nachdem mehrere Autoren einen direkten Einfluß von hGH auf die Insulinsekretion mittels in vitro-Techniken nicht hatten nachweisen können (88, 89), gelang es CURRY 1974 (90) mit der Perfusionsmethode am Rattenpankreas eine hGH-induzierte Insulinausschüttung zu demonstrieren. Die systemische hGH-Wirkung mit einer mehrere Stunden anhaltenden Erniedrigung der Insulinspiegel nach hGH-Applikation konnte ADAMSON mittels in vivo-Versuchen zeigen (91). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein direkter Effekt von Wachstumshormon auf die Inselzelle zu vermuten ist.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, führt humanes Wachstumshormon im Perifusat nicht zu einer Änderung der durch 5 mM Glukose induzierten Insulinfreisetzung. Auch extrem hohe hGH-Spiegel (1000 ng/ml) zeigen keinen stimulierenden Effekt auf die basale Insulinsekretion. Eine inhibierende Wirkung ist ebenfalls nicht festzustellen. Weder die Unterbrechung noch eine erneute Stimulation führen zur Änderung des basalen Sekretionsmusters von Insulin.

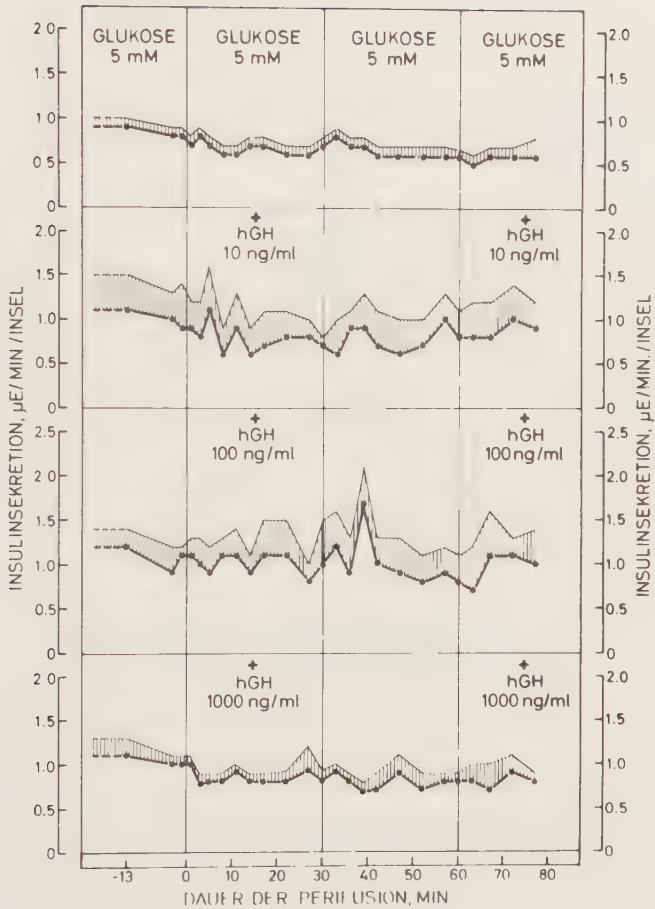


Abb. 11: Einfluß von Wachstumshormon (hGH) in verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 100 und 1000 ng/ml) auf die basale Insulinsekretion (n=6).

3.2.2. Einfluß von Wachstumshormon auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Bei in vivo-Versuchen am Menschen konnte ADAMSON (91) zeigen, daß nach Glukoseinfusionen in verschiedener Konzentration im Anschluß an die Applikation von hGH die daraus resultierende verschlechterte Glukosetoleranz mit einer verminderten Insulinantwort des Organismus korreliert war.

In Analogie zu diesem Vorgehen versuchten wir herauszufinden, ob Wachstumshormon in vitro in der Lage ist, die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung zu modifizieren. Im Anschluß an eine Stimulation mit 40 mM Glukose wurde zusätzlich hGH in Konzentrationen von 100 bzw. 1000 ng/ml perifundiert. Abschließend wurde nochmals mit Glukose allein stimuliert (Abb. 12, 13). Während der 30-minütigen hGH-Perifusion ist keine Änderung des Insulinsekretionsmusters gegenüber der Kontrolle ohne hGH erkennbar. Es fällt allerdings auf, daß nach Eliminierung des Wachstumshormons aus der Perifusionslösung ein deutlicher - wenn auch verzögerter - Anstieg der Insulinfreisetzung zu beobachten ist.

3.2.3. Einfluß einer Präperifusion mit Wachstumshormon auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion

Wahrscheinlich handelt es sich bei der Wirkung von hGH auf die beta-Zelle eher um einen Langzeiteffekt und nicht um eine akute Wirkung. Darauf deuten unter anderem die Hyperinsulinämie bei akromegalen Patienten wie auch die hohen Insulinwerte nach chronischer Gabe von hGH hin (66, 92), obgleich hohe Insulinwerte auch reaktiv als Antwort auf die durch hGH induzierte periphere Insulinresistenz zu erklären sind.

Im Perifusionsexperiment haben wir einen "chronischen" hGH-Effekt dadurch nachzuahmen versucht, daß wir die isolierten Pankreasinseln zunächst mit 5 mM Glukose und Wachstumshormon in zwei verschiedenen Konzentrationen (1000 ng/ml und 2000 ng/ml) 60 Minuten lang präperifundiert haben. Anschließend wurde mit 40 mM Glukose

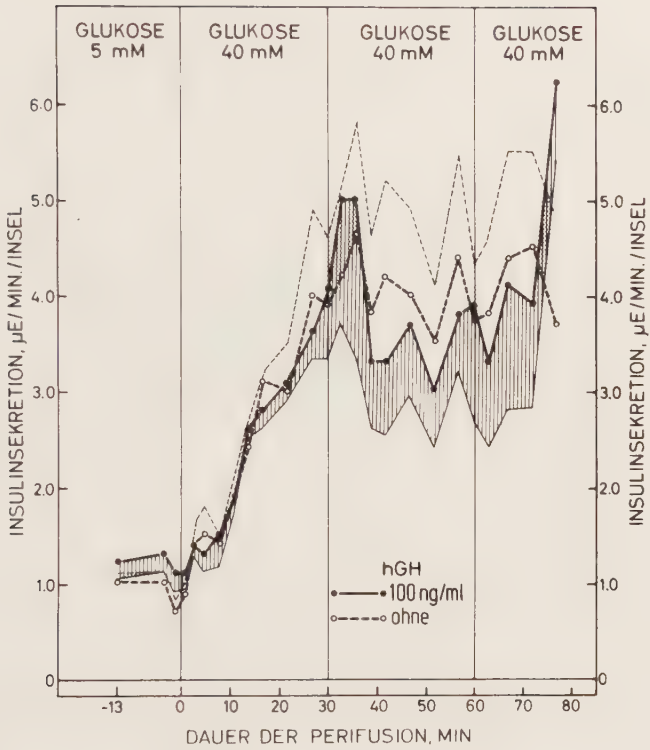


Abb.12: Einfluß von hGH (100 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=4).

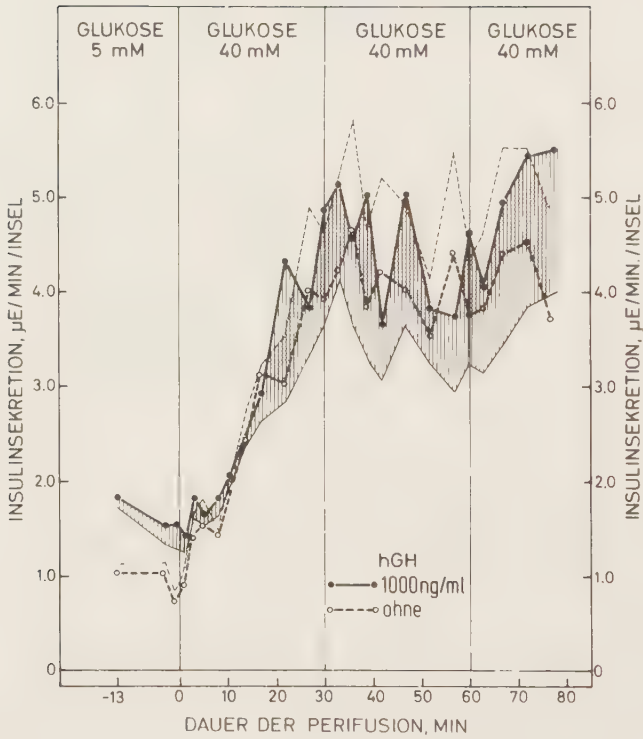


Abb. 13: Einfluß von hGH (1000 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=4).

mit und ohne hGH stimuliert (Abb. 14, 15).

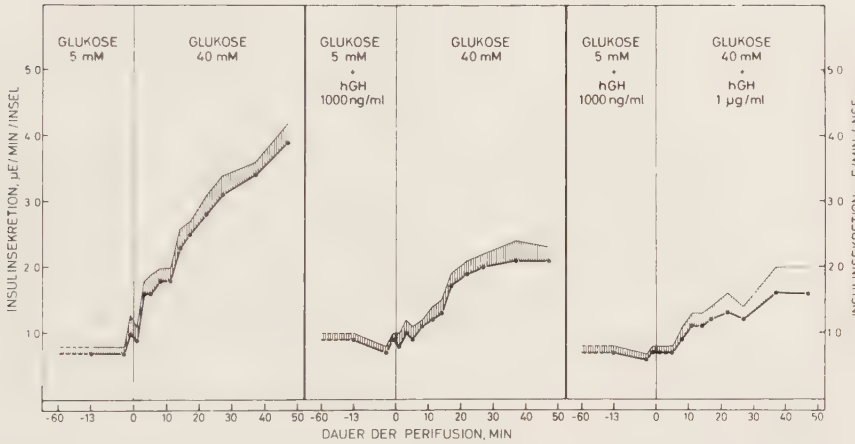


Abb. 14: Einfluß einer Präperifusion mit hGH (1000 ng/ml) auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=8).

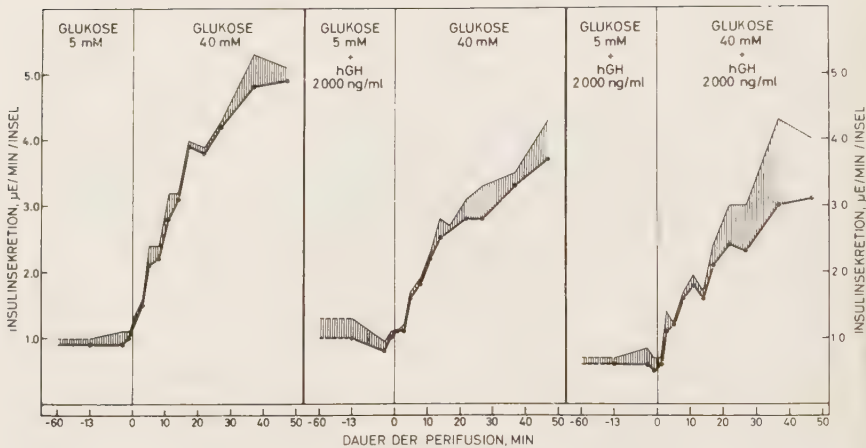


Abb. 15: Einfluß einer Präperifusion mit hGH (2000 ng/ml) auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=2).

In beiden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, daß die Insulinsekretion nach Präperifusion mit hGH verzögert eintritt und insgesamt vermindert ist. Beläßt man hGH auch während der Stimulation mit 40 mM Glukose im Perifusat, so ergibt sich eine gegenüber der Stimulation nach Eliminierung von hGH noch stärkere Supprimierung und Verzögerung der Insulinausschüttung.

Die Erhöhung der hGH-Konzentration auf 2000 ng/ml (Abb. 15) ergab keinen signifikanten Unterschied gegenüber 1000 ng/ml. Die Ansprechbarkeit der Langerhans'schen Inseln war in dieser Versuchsreihe etwas besser, so daß die Sekretionsantwort unter allen drei Bedingungen schneller erfolgte. Der Unterschied zwischen der Stimulation mit und der ohne hGH nach Präperifusion mit Wachstumshormon war nicht so deutlich wie bei der niedrige-

ren hGH-Konzentration.

Durch Gabe von hGH über längere Zeit scheint demnach die Empfindlichkeit der beta-Zellen gegenüber maximal stimulierenden der Glukose herabgesetzt zu sein.

3.3. Einfluß von Adiuretin (ADH) auf die Insulinsekretion

3.3.1. Einfluß von ADH auf die basale Insulinsekretion

Um einen Effekt des antidiuretischen Hormons auf die durch 5 mM Glukose induzierte Basalsekretion von Insulin zu untersuchen, wurde mit ADH-Konzentrationen von 1, 10 und 100 ng/ml perfundiert. Im Vergleich zu der allein durch Glukose provozierten Insulinsekretion ergaben sich durch die Zugabe von Vasopressin keine meßbaren Änderungen der Insulinsekretionsraten (Abb. 16).

3.3.2. Einfluß von ADH auf die Glukose- induzierte Insulinsekretion

Nach maximaler Stimulierung der Pankreasinseln mit 40 mM Glukose wurde ADH in einer Konzentration von 1 und 10 ng/ml zugegeben (Abb. 17 und 18). Im Vergleich zu den internen Kontrollen führte ADH zu einem allmählichen aber deutlichen Absinken der Sekretionswerte für Insulin. Dieser Effekt scheint nicht konzentrationsabhängig zu sein, da zwischen der Versuchsreihe mit 1 ng/ml ADH und der mit 10 ng/ml ADH kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist. Nach Unterbrechung der ADH-Perifusion bei persistierender Glukosestimulation kam es zu einem allmählichen Anstieg der Insulinsekretion, der jedoch im Beobachtungszeitraum der Experimente nicht die Ausgangswerte vor der ADH-Perifusion erreichte.

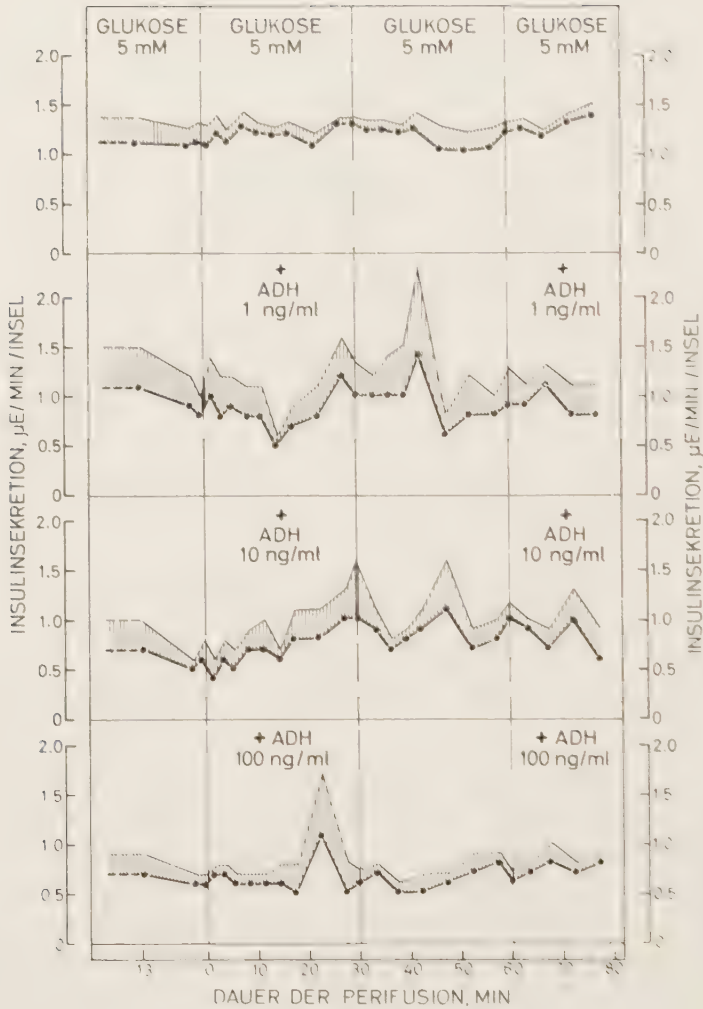


Abb. 16: Einfluß von Adiuretin (ADH) in verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 10 und 100 ng/ml) auf die basale Insulinsekretion (n=6).

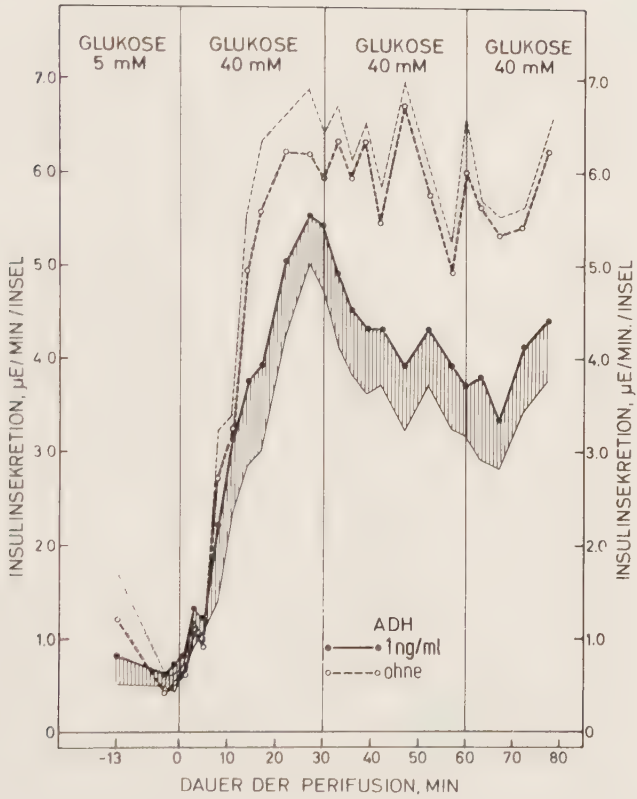


Abb. 17: Einfluß von ADH (1 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

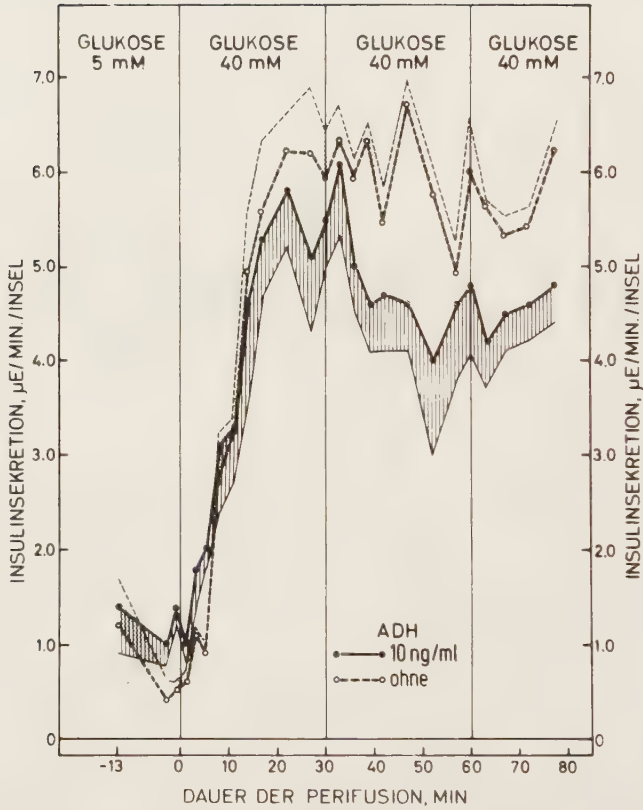


Abb. 18: Einfluß von ADH (10 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

3.3.3.

Einfluß einer Präperifusion mit ADH
auf die nachfolgende Glukose-induzierte
Insulinsekretion

Zur Klärung der Frage, welchen Effekt eine längere ADH-Einwirkung auf die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung haben kann, wurde 60 Minuten lang mit ADH in einer Konzentration von 100 ng/ml vorperifundiert und anschließend mit 40 mM Glukose mit oder ohne ADH-Zugabe stimuliert (Abb. 19).

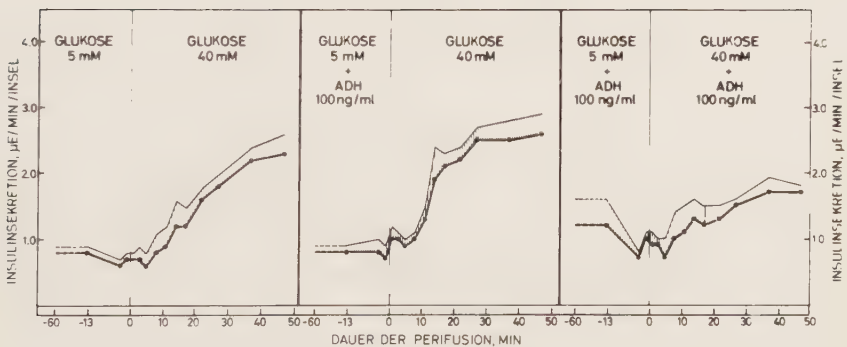


Abb. 19: Einfluß einer Präperifusion mit ADH (100 ng/ml) auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

Wird im Anschluß an die Hormonpräperifusion mit Glukose stimuliert, so erreicht die Insulinsekretion in etwa die gleiche Höhe wie bei den Kontrollversuchen ohne Präperifusion mit ADH. Allerdings steigt die Insulinsekretion nach Elimination von

ADH bedeutend steiler an und erreicht schneller das maximale Sekretionsniveau als bei den Kontrollversuchen. Dieses Phänomen könnte als Deinhibierung eines Hormoneffektes von ADH auf die durch Glukose provozierte Insulinsekretion gedeutet werden. Der zugrundeliegende Hemmeffekt wird jedoch nicht während einer basalen Insulinsekretion sichtbar (vgl. Abb. 16).

Die Fortführung der ADH-Perifusion nach entsprechender Prä-perifusion mit Adiuretin bei gleichzeitiger Stimulation mit 40 mM Glukose führt dagegen zu einer signifikanten Suppression der Insulinsekretion auf etwa 50% der Kontrollwerte (Abb.19).

3.4. Einfluß von Lipotropin auf die Insulinsekretion

3.4.1. Einfluß von Lipotropin auf die basale Insulinsekretion

Das aus Schweinehypophysen isolierte Lipotropin-Polypeptid B soll nach FUSSGÄNGER (74) und WEISWEILER (76) einen insulino-tropen Effekt haben, was im Perfusionsversuch bzw. mittels in vivo-Experimenten mit Kaninchen gezeigt wurde. Um diese Befunde mit einem hochgereinigten Lipotropin in vitro zu untermauern, wurde zunächst die basale Insulinsekretion in Anwesenheit von 5 mM Glukose nach zusätzlicher Perifusion mit Lipotropin in einer Konzentration von 100 bzw. 1000 ng/ml untersucht. Die Abbildung 20 zeigt, daß nach der Zugabe von 100 ng/ml Lipotropin zum Perifusat keine Änderung im Sekretionsverhalten von Insulin eintritt. Dagegen scheint die hohe Konzentration von Lipotropin (1000 ng/ml) zur allmählichen Hemmung der Insulinsekretion zu führen, die auch nach Absetzen der Lipotropinperifusion persistiert.

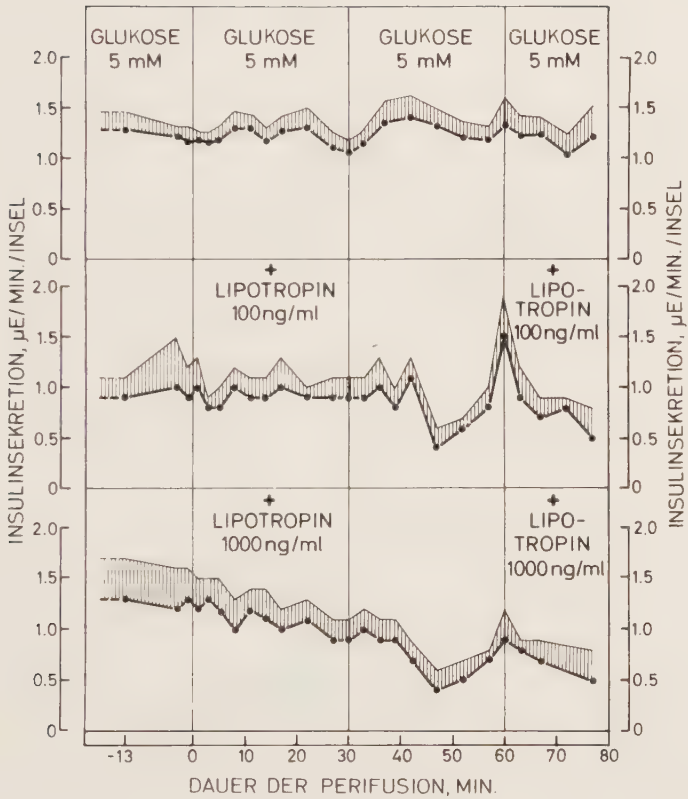


Abb. 20: Einfluß von Lipotropin in verschiedenen Konzentrationen (0, 100 und 1000 ng/ml) auf die basale Insulinsekretion (n=6).

3.4.2.

Einfluß von Lipotropin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Nachdem zwei Arbeitsgruppen von einer Langzeithyperglykämie nach Lipotropin-Applikation berichteten (76, 93) und deren Ursache in einer direkten Beeinflussung der Inselzellfunktion vermuteten, sollte der Einfluß von Lipotropin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion untersucht werden. Im Gegensatz zur Kontroll-perifusion mit 40 mM Glukose allein, kommt es unter Zugabe von Lipotropin (Abb. 21 und 22) zu einer signifikanten, weitgehend dosisabhängigen Senkung der Insulinsekretion. Der inhibierende Effekt von Lipotropin auf die Glukose-provozierte Insulinsekretion wird nach Weglassen von Lipotropin aus dem Perifusat zumindest partiell wieder aufgehoben (Abb. 22).

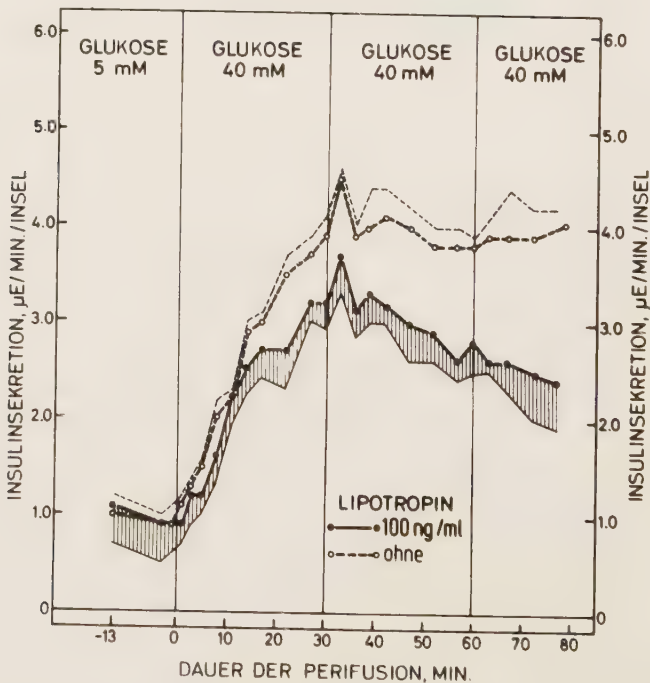


Abb. 21: Einfluß von Lipotropin (100 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

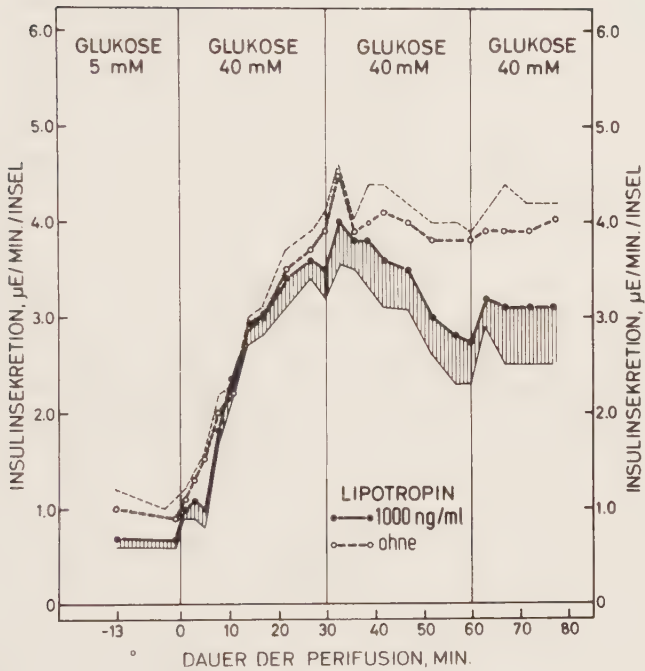


Abb. 22: Einfluß von Lipotropin (1000 ng/ml) auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

3.4.3. Einfluß einer Präperifusion mit Lipotropin auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion

Um die Sekretionskinetik der isolierten Langerhans'schen Inseln unter längerer Beeinflussung durch Lipotropin zu beobachten, wurde mit Peptid B in einer Konzentration von 1000 bzw. 2000 ng/ml präperifundiert. Die anschließende Stimulation mit 40 mM Glukose allein zeigte gegenüber der Kontrollperifusion ohne Lipotropin-Vorbehandlung eine deutlich niedrigere maximale Insulinausschüttung sowie einen verzögerten Anstieg der Insulinsekretion (Abb. 23). Bei

den Versuchen mit der höheren Lipotropinkonzentration (2000 ng/ml) fanden sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Experimenten mit 1000 ng/ml (Abb. 24). Wurde zur Glukosestimulation weiter mit Lipotropin 1000 ng/ml perifundiert, so war der supprimierende Effekt auf die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung wesentlich ausgeprägter (Abb. 23). Dieses Phänomen konnte jedoch für die höhere Lipotropinkonzentration nicht gefunden werden.

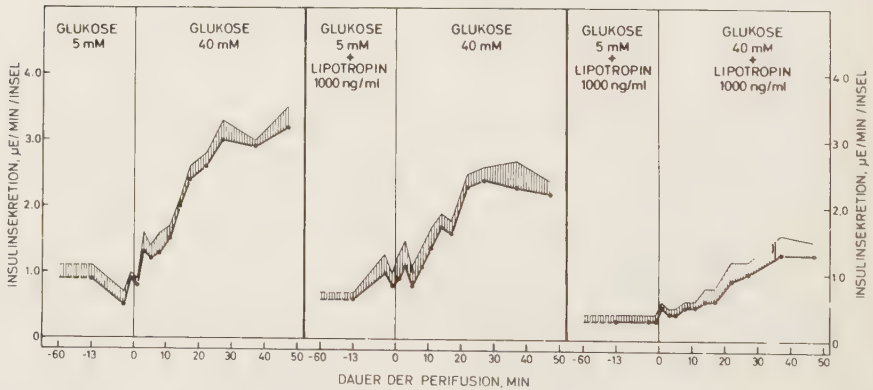


Abb. 23: Einfluß einer Präperifusion mit Lipotropin (1000 ng/ml) auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

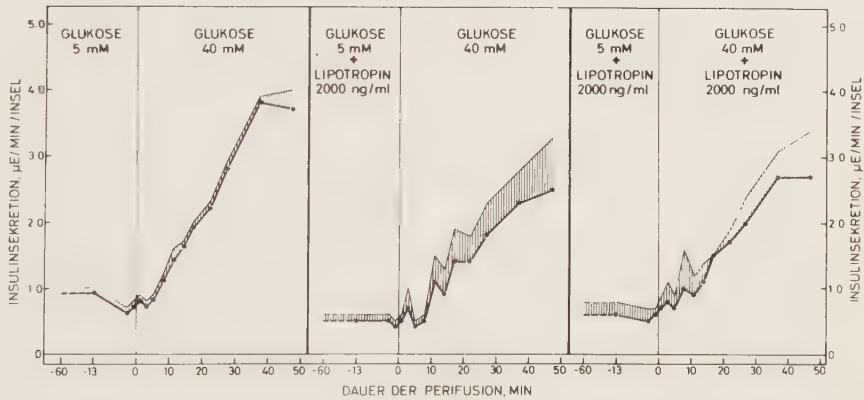


Abb. 24: Einfluß einer Präperifusion mit Lipotropin (2000 ng/ml) auf die nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=2).

4. DISKUSSION

4.1. Wachstumshormon (hGH) und Insulinsekretion

Schon 1924 konnte HOUSSAY (63) zeigen, daß bei Hunden nach Hypophysektomie eine erhöhte Empfindlichkeit der peripheren Gewebe gegenüber Insulin mit Neigung zur Hypoglykämie auftrat. Ferner berichtete er, daß bei pankreatektomierten Tieren durch anschließende Hypophysektomie eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage erzielt werden konnte. Die Hunde überlebten ohne Zufuhr von Insulin. Die damit dokumentierte Beziehung zwischen Kohlehydratstoffwechsel und dem Hypophysenvorderlappen wurde durch YOUNG (94) und HOUSSAY et al. (95) bestätigt, die bei Hunden durch Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakt eine verminderte Glukosetoleranz fanden. Ebenfalls vermindert ist die Glukosetoleranz bei akromegalen Patienten, auch wenn ein manifester Diabetes nur in ca. 20 % der Fälle auftritt (31, 65). Bei Akromegalen sind nach verschiedenen Autoren sowohl die Basalsekretion von Insulin als auch die stimulierte Insulinausschüttung erhöht (31, 65).

LUFT und CERASI (66) behandelten mehrere Fälle von Panhypopituitarismus mit Wachstumshormon. Danach stieg der Nüchterninsulinspiegel signifikant an und die Insulinsekretion nach Glukosebelastung war überschießend. Als Erklärung für die auftretende Hyperinsulinämie bei gleichzeitig gestörter Glukosetoleranz postulierten die Autoren einen spezifischen, peripher angreifenden Insulin-Inhibitor. MARTIN und GAGLIARDINO (64) konnten bei hypophysektomierten Ratten durch Inkubationsversuche mit isolierten Pankreasinseln ebenfalls eine reduzierte Insulinsekretion nach Glukosestimulation nachweisen. Durch Vorbehandlung mit hGH konnte die Insulinfreisetzung weitgehend wiederhergestellt werden. Ferner stellten sie fest, daß der Insulingehalt der Pankreasinseln hypophysektomierter Ratten herabgesetzt und die Insulinbiosynthese gemessen am Einbau von radioaktiv markiertem Leucin in das Inselgewebe eingeschränkt ist. Diese Befunde

konnten von MALAISSE et al. bestätigt werden (89). Die Autoren konnten auch zeigen, daß die Insulinvorräte der Pankreasinseln nach Behandlung mit Wachstumshormon vom Schaf normalisiert werden können.

Die Entfernung der Hypophyse führt nicht nur zu einer verminderten Insulinbiosynthese, sondern auch zu einer herabgesetzten Ansprechbarkeit der beta-Zellen auf einen Glukosereiz (96).

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Versuche von MERIMEE et al. (97), die bei Minderwüchsigen auf Grund eines isolierten hGH-Mangels gegenüber einem Normalkollektiv eine verminderte Insulinsekretion nach Glukose- und Arginin-Applikation fanden. Nach fünftägiger Behandlung mit Wachstumshormon war die Insulinantwort auf das drei- bis fünf-fache erhöht. Demgegenüber war die Insulinsekretion nach Tolbutamid- oder Glukagongabe normal, eine vorangehende hGH-Behandlung blieb ohne Effekt. Die Autoren postulieren daher zwei Arten der Insulinausschüttung, die eine abhängig, die andere unabhängig von hypophysärer Kontrolle. Die beiden Freisetzungsmechanismen für Insulin könnten durch verschiedene Rezeptoren bzw. durch unterschiedliche Kompartimentierung von Insulin in der beta-Zelle bedingt sein.

Die Einwirkung von Wachstumshormon auf die Kinetik der Insulinsekretion im Perfusionsexperiment wurde erstmals von CURRY et al. untersucht (98). Nach Hypophysektomie war die Insulinausschüttung nach Glukosestimulation in der ersten Sekretionsphase um 70%, in der zweiten um 30% reduziert. Eine hGH-Substitution normalisierte nur die zweite Phase, während eine Cortisol- bzw. ACTH-Applikation beide Phasen auf das normale Sekretionsniveau nicht operierter Ratten anhub. Für die dem Wachstumshormon in der Aminosäuresequenz homologen Hormone, wie plasmin modified hGH und human chorionic somatomammotropin, ergaben sich nach Untersuchungen von BENNETT et al. (99) und MALAISSE (100) ähnliche phasenabhängige insulinotrope Effekte wie für hGH. Die hypophysäre Kontrolle der endokrinen Pankreasfunktion scheint danach verschiedene Angriffspunkte zu haben und von mehreren Hormonen kontrolliert und reguliert zu werden.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde vermutet, daß das Wachstumshormon einen ätiologischen Faktor bei der Entstehung des Diabetes mellitus darstellt (101, 102). Obwohl in verschiedenen Arbeiten ein erhöhter hGH-Spiegel beim Diabetiker nachgewiesen werden konnte (121), ist bisher nicht endgültig geklärt, ob erhöhte hGH-Spiegel beim Diabetiker als sekundärer Effekt oder als auslösender Faktor zu deuten sind (66, 103, 104).

Auf Grund dieser bisher gefundenen Zusammenhänge liegt die Vermutung nahe, daß neben der indirekten Verknüpfung von Wachstumshormon und Glukosehomöostase via Glukoneogenese, Fettstoffwechsel und Glukoseaufnahme durch die Zelle im Sinne eines Insulin-antagonismus in peripheren Geweben auch eine direkte Wirkung von STH auf die Inselzellfunktion zu diskutieren ist.

Während die oben geschilderten Ergebnisse, die sich in erster Linie auf Zustände mit chronischem hGH-Mangel oder chronischen hGH-Exzess stützen, bei allen Autoren ziemlich übereinstimmend ausfallen, ist die Frage der akuten Wirkung von Wachstumshormon auf die Funktion der beta-Zellen bisher kontrovers beantwortet worden (67, 105, 106). ADAMSON konnte am Menschen eine akute, mit der Verschlechterung der Glukosetoleranz korrelierte Herabsetzung der Plasma-Insulinspiegel und Inhibierung der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung demonstrieren (91). Mit in vitro-Systemen wurde von einigen Autoren kein Effekt von hGH auf die Insulinsekretion festgestellt (88, 89). CURRY et al. jedoch fanden eine stimulierte Insulinausschüttung nach Wachstumshormon im Perfusionsexperiment (90), was von TAI et al. bestätigt werden konnte (107).

Unsere vorliegenden Resultate zeigen im Gegensatz dazu eher einen inhibierenden Einfluß von hGH auf die Sekretionsfunktion der beta-Zelle. Dieser manifestiert sich einerseits in dem verzögerten Anstieg der Insulinfreisetzung nach der hGH-Perifusion (Abb. 12, 13), was als Restitution der durch Wachstumshormon supprimierten Insulinbiosynthese gedeutet werden könnte (96). Eindrucksvoller noch zeigt sich die hGH-Wirkung in dem verminderten Stimulationserfolg von 40 mM Glukose nach Präperifusion mit Wachstumshormon (Abb. 14, 15).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von ADAMSON (91) und CERASI et al. (106) überein, die bei gesunden Versuchspersonen nach hGH-Gabe neben einer über Stunden anhaltenden verschlechterten Glukosetoleranz auch eine Verminderung der Insulinsekretion zeigen konnten. Die Applikation von hGH führte nicht nur zu einer Unterempfindlichkeit der beta-Zelle für Glukose, sondern auch für Tolbutamid und Glukagon. Das Wachstumshormon kann somit neben seinen Insulin-antagonistischen Effekten in der Körperperipherie auch Insulinsekretions-hemmend wirken und damit ähnlich wie Adrenalin eine Hyperglykämie induzieren, die zum Beispiel in einer Stress-Situation notwendig ist.

Über den Wirkungsmechanismus nach akuter und chronischer Applikation oder unter physiologischen Bedingungen ist wenig bekannt. Anhand der hier vorliegenden Resultate läßt sich nur sagen, daß hGH an der beta-Zelle wahrscheinlich eine nicht sofort eliminierbare Veränderung hervorruft. Darauf deutet die Suppression der durch Glukose induzierten Insulinfreisetzung im Anschluß an die hGH-Präperifusion hin (Abb. 14).

PARK et al. (108) und HJALMARSON (109) stellten nach chronischer hGH-Zufuhr am Diaphragma hypophysektomierter Ratten Veränderungen des Zuckerstoffwechsels am quergestreiften Muskel fest. Ähnliche Vorgänge an den Pankreasinseln, die allerdings noch nachgewiesen werden müssen, würden erklären, wieso bei unseren Versuchen ein deutlicher Effekt von hGH erst nach längerer Zufuhr (Präperifusion) zu erzielen war. Ferner wird nach KOSTYO et al. (110) ebenfalls im quergestreiften Muskel unter hGH der c-AMP-Gehalt gesenkt. Dieser Zusammenhang könnte für die beta-Zellen ebenfalls von Bedeutung sein, da c-AMP bei der Regulierung der Funktion der Langerhans'schen Inseln eine entscheidende Rolle spielt.

4.2. Adiuretin (ADH) und Insulinsekretion

Das hypothalamische Hormon Arginin-Vasopressin ist seit langem als Regulator der Serumosmolarität auf Grund seiner antidiuretischen Wirkung bekannt. In diesem Zusammenhang ist die Entdeckung von ORLOFF und HANDLER (111) interessant, daß zyklisches 3'5'-AMP (c-AMP) den Effekt von Vasopressin am Zielorgan (Nierentubulus)

simuliert. Der x-chromosomal vererbte nephrogene Diabetes insipidus wird von FICHMAN und BROOKER (112) auf einen Defekt des renalen c-AMP-Rezeptorsystems zurückgeführt. Vasopressin scheint darüber hinaus jedoch auch in Geweben außerhalb der Niere das zyklische AMP-System zu stimulieren (113). Da auch bei der Freisetzung von Insulin aus der beta-Zelle des Pankreas zyklisches Adenosinmonophosphat eine entscheidende Rolle spielt, wurde die direkte Vasopressinwirkung auf die Funktion der isolierten Inselzelle untersucht.

Erste Beobachtungen über eine Verbindung zwischen der Osmoregulation durch ADH und der Glukosehomöostase stammen bereits aus dem Jahre 1908 von BORCHARDT (71). Er konnte bei in vivo-Versuchen mit Kaninchen durch Applikation eines infundibulären Extraktes eine Hyperglykämie provozieren. Bestätigt wurde dieses Ergebnis von GEILING und EDDY (114) durch Arginin-Vasopressin-Injektion ebenfalls im Tierversuch sowie auch beim Menschen (115).

Im Gegensatz zu dieser eindeutig stimulierenden Wirkung des ADH auf die Glukosekonzentration im Blut stehen die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Insulinsekretion nach exogener Vasopressinapplikation. SURYANARAYANA und KENT (75) konnten bei Messungen am Menschen zwar den hyperglykämischen Effekt nach Pitressingabe (natürliches Gemisch aus Lysin- und Arginin-Vasopressin) bestätigen, die Insulin- und auch hGH-Spiegel blieben dagegen konstant. Die unveränderte hGH-Konzentration läßt vermuten, daß das Wachstumshormon für die Hyperglykämie nicht verantwortlich gemacht werden kann. Auch ein möglicher stress-bedingter Adrenalineffekt scheidet aus, da die Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut auch bei adrenaletomierten Personen beobachtet werden konnte (75).

Unterstützt werden die Ergebnisse über eine fehlende Wirkung von ADH auf das endokrine Pankreas durch Perfusionsversuche mit Hunden, bei denen eine Steigerung der zirkulierenden Insulinkonzentration nach Gabe von Lysin-Vasopressin (dem bei Schweinen wirksamen antidiuretischen Hormon) nicht beobachtet werden konnte (72). Auch MALAISSE (10) stellte mittels Inkubation von Pankreas-

teilchen keinen Einfluß von Pitressin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion fest.

Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den bisherigen, allerdings mit einer Ausnahme alle mittels in vivo-Systemen gewonnenen Resultaten, die eine Wirkung von ADH auf die Inselzellen eher unwahrscheinlich machen. Sowohl bei den Versuchen, in denen ADH plus submaximale Konzentrationen Glukose perifundiert wurden (Abb. 17, 18), als auch nach Präperifusion von ADH und anschließender Stimulation (Abb. 19) konnte in unseren Experimenten eine supprimierende Wirkung von Vasopressin auf die durch Glukose stimulierte Insulinsekretion gezeigt werden. Im Vergleich zum Wachstumshormon, das einen chronischen Effekt auf die Insulinausschüttung auch nach Eliminierung aus der Perifusionslösung erkennen läßt (vgl. 3.3.3.), scheint es sich beim ADH eher um einen akuten Effekt zu handeln, der rasch reversibel ist. Darauf weist vor allem der steile Anstieg der Insulinsekretion unter Glukosestimulation nach ADH-Präperifusion hin, der im Vergleich zur Kontrollstimulation ohne ADH-Vorbehandlung steiler verläuft und früher das maximale Sekretionsniveau erreicht. Dieses Phänomen kann im Sinne einer Akzeleration der zuvor inhibierten Sekretionsvorgänge gewertet werden und deutet an, daß es sich bei der Adiuretinwirkung weniger um chronische Veränderungen an der beta-Zelle als vielmehr um eine kurzfristige Beeinflussung der Zellfunktion handeln muß. Ob dies zum Beispiel durch Eingriff in den Kalziumhaushalt oder das Adenylcyclasesystem der beta-Zelle erfolgt, muß offen bleiben. ADH kann seine Wirkung auf die stimulierte Pankreasinsel nur entfalten, wenn es auch während der Glukosestimulation im Perifusat enthalten ist; auch dies bestätigt die angestellten Überlegungen zum Wirkungsmechanismus des Hormons. Der inhibierende Effekt ist dann allerdings deutlich: Die Insulinsekretion erreicht nur etwa 50% der Höhe, die ohne ADH erreicht wird (Abb. 19). Ob die von uns gefundene akute und reversible Änderung der Sekretionskinetik der beta-Zelle durch c-AMP vermittelt wird, bleibt ungeklärt.

Eine Erklärung für die Hyperglykämie ohne Veränderung des Insulin-

spiegels nach Vasopressin-Belastung bei in vivo-Experimenten bieten zur Zeit nur die Versuche von EEST und TAYLOR (73), die eine Assoziation zwischen erhöhter Blutglukose und vermindertem Glykogengehalt der Leber ergaben. In die gleiche Richtung weisen Versuche mit Hunden von BERGEN et al. (116), die einen signifikant erhöhten hepatoportal Gradienten für Glukose nach intraportaler Gabe von Vasopressin konstatierten. Diese Ergebnisse verweisen auf die Leber als mögliche Quelle für die erhöhte Glukosekonzentration im Blut nach ADH-Applikation. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß das Vasopressin über eine Erhöhung des c-AMP im Lebergewebe zur Aktivierung der Phosphorylase und damit zur Glukosefreisetzung führt (75). Diese Spekulation bedarf allerdings noch der experimentellen Bestätigung. Die durch extrahepatische ADH-Wirkung hervorgerufene Glukosemobilisation und die durch unsere Experimente gezeigte Suppression von Insulin nach ADH gemeinsam können die bei in vivo-Versuchen gemessene deutliche Hyperglykämie nach ADH-Applikation als Nettoeffekt der beiden Adiuretineffekte erklären. Dieser Zusammenhang bietet Anlaß genug, das ADH neben Adrenalin und Wachstumshormon als ein weiteres wichtiges "Stresshormon" zu betrachten (125).

4.3. Lipotropin und Insulinsekretion

1931 entdeckten ANSELMINO und HOFFMANN (117) ein "Fettstoffwechselhormon" im Hypophysenvorderlappen von Schweinen, das mit den bisher bekannten Vorderlappenhormonen nicht identisch war und lipolytische Wirkung besaß. TRYGSTAD (93, 118) berichtete über einen lipid mobilizing factor (LMF) und dessen von der Konzentration abhängigen Effekt auf den Kohlehydratmetabolismus in Form einer Langzeithyperglykämie. Als Ursache wurde ein peripherer Insulinantagonismus oder eine direkte Wirkung auf die Insulinsekretion diskutiert. Ferner wurde festgestellt, daß der Glykogengehalt der Leber nach LMF-Applikation beim Kaninchen abnimmt (118). RUDMAN et al. isolierten mittels Ionen-Austausch-Chromatographie zwei "lipolytic peptides" und zeigten deren lipolytische und hyperglykämische Wirkung an Hand von in vitro-

Experimenten mit Kaninchen (123). Bei ihren Versuchen mit aus Schweinehypophysen gewonnenem lipidmobilisierenden Peptid A fanden SCHWANDT et al. (77) einen biphasischen Anstieg der Glukosekonzentrationskurve und führten dies auf periphere Wirkungen des Lipotropins zurück. Erste Erkenntnisse über die Wirkung des lipolytischen Hormons auf den Insulinspiegel teilten FUSSGÄNGER et al. (74) mit, die am perfundierten Pankreas von Ratten eine um 100 % gesteigerte Insulinsekretion nach Lipotropingabe beobachteten. Der insulinotrope und gleichzeitig hyperglykämische Effekt des Lipotropins wurde später erneut von WEISWEILER und SCHWANDT experimentell bestätigt (76), wobei zwischen der stimulierten Insulinsekretion und der Erhöhung der Glukose und der freien Fettsäuren im Blut keine zeitliche Korrelation zu entdecken war.

Ob es sich bei der Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch das hypophysäre fettmobilisierende Hormon um ein peripheres Geschehen handelt oder eher um einen direkten Effekt auf die Funktion der Langerhans'schen Inseln, ist somit letztlich unklar.

Im Widerspruch zu den in vivo-Versuchen anderer Autoren (74, 76) fanden wir neben der Suppression der basalen Insulinsekretion durch Lipotropin in hoher Konzentration (Abb. 20) eine Verminderung der Ansprechbarkeit der beta-Zellen auf einen Glukosereiz, der sowohl während einer akuten Stimulationsphase (Abb. 21, 22), als auch in Form eines "chronischen" Effektes nach längerer Vorbehandlung (Präperifusion) mit Lipotropin (Abb. 23, 24) auftrat. Diese unterschiedlichen Auswirkungen lassen sich nach den unter anderem von HELLMANN et al. (119) entwickelten Modellvorstellungen über den Sekretionsmechanismus von Insulin einerseits durch einen antagonistischen Effekt von Lipotropin auf die durch Glukose induzierte Insulinfreisetzung erklären. Für die persistierende Wirkung des Hormons auch nach seiner Elimination aus dem Perifusat ist andererseits eine nicht sofort reversible Veränderung der Erkennungsstelle des Stimulus (Glukose) an der Zellmembran der beta-Zelle z.B. durch eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls für Glukose zu diskutieren.

Für die offensichtliche Diskrepanz zwischen der hemmenden Wirkung des Lipotropins bei unseren in vitro-Experimenten und des insulin-

tropen Effekts bei Untersuchungen anderer Autoren (74, 76) bietet sich in erster Linie die Mitteilung von FUSSGÄNGER et al. (76) an, daß nach Applikation von Lipotropin nicht nur die Insulinsekretion um 100 %, sondern auch die Glukagonausschüttung um 200 % erhöht wird. Auch die Vermutung, daß Lipotropin die Glykogenolyse und die Glukoneogenese stimuliert und gleichzeitig die Glukoseutilisation durch die Zellen hemmt (77), trägt dazu bei, den vermeintlichen Widerspruch zu erklären. Es kann angenommen werden, daß durch diese Lipotropinwirkungen außerhalb der beta-Zelle der mit den hier dargestellten Perifusionsexperimenten belegte direkte inhibierende Einfluß überlagert wird. Weitere Untersuchungen mit hochgereinigtem Lipotropin sind jedoch notwendig, um über dessen Einfluß genauere Aussagen machen zu können.

Es fällt auf, daß keines der verwendeten Hormone die Basalsekretion von Insulin durch 5 mM Glukose modifizierte. Auch die Wirkung der Polypeptide auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion war in allen Versuchsreihen nur mäßig ausgeprägt. Erst die Experimente mit Präperifusion der verschiedenen Hormone zeigten signifikante Veränderungen der Sekretionskinetik von Insulin. Daraus kann man schließen, daß bei der Perifusion isolierter Pankreasinseln die Wirkung zugeführter Hormone am deutlichsten als Langzeiteffekt dieser Substanzen auf die Inselzellen zutage tritt.

Ähnliche Erfahrungen liegen auch von anderen Autoren vor. NORFLEET et al. (85) verglichen den Effekt von Somatostatin auf eine Glukose-bedingte Insulinsekretion im Perfusionsexperiment mit den Ergebnissen unter gleichen Bedingungen bei Versuchen mit perfundierten isolierten Pankreasinseln. Während es bei der Perfusion zu einer signifikanten Inhibierung der stimulierten Insulinausschüttung kam, blieb die Insulinsekretion bei der Perifusion durch Somatostatin unbeeinflusst. TURCOT-LEMAY et al. (120) demonstrierten, daß eine Organkultur von isolierten Pankreasinseln deren Ansprechbarkeit auf Somatostatin nachhaltig verändert. Nach Inkubation frischer Inseln mit Somatostatin stellten sie eine Suppression der Insulinsekretion um ca. 40 % fest, während diese nach Inkubation der vorher kultivierten Inseln ca. 90 % betrug.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß eine passagere Beeinflussung der Langerhans'schen Inseln durch die Isolierungsmethode mittels Collagenase nicht auszuschließen ist. Die Veränderungen könnten vor allem die Zellmembran bzw. die für den Hormoneffekt notwendigen Rezeptormoleküle betreffen. Der Schaden scheint jedoch nicht irreversibel zu sein, wie die erhöhte Sensibilität der Inseln nach Organkultur (120) und nach Präperifusion zeigt, wie sie bei unseren Experimenten zur Anwendung kam.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Über die hormonelle Kontrolle der beta-Zellfunktion der Pankreasinseln liegen bisher widersprüchliche Ergebnisse vor. Um eine peripher bedingte indirekte Beeinflussung von einem möglichen direkten Effekt der untersuchten Hormone hGH, ADH und Lipotropin zu trennen, wurde die Perifusionsmethode von Collagenase-isolierten Ratten-Pankreasinseln verwendet. Für jedes Hormon wurde dessen Wirkung auf die Basalsekretion, auf die durch Glukose stimulierte Sekretion von Insulin sowie der Effekt einer Präperifusion mit dem Hormon auf die Glukose-induzierte Stimulation untersucht. Keine der untersuchten Substanzen hatte einen signifikanten Einfluß auf die Basalsekretion von Insulin bei Perifusion mit 5 mM Glukose. Wachstumshormon (hGH) blieb auf die maximal stimulierte Insulinsekretion ohne Wirkung, nach Elimination von hGH aus dem Perifusat kam es allerdings zu einem deutlichen "off-effect" mit erhöhter Insulinausschüttung. Ergänzt wurde dieser Hinweis auf eine inhibierende Wirkung von Wachstumshormon durch die Präperifusions-Experimente: Nach längerer Einwirkungszeit von hGH auf die beta-Zellen wurde deren Empfindlichkeit gegenüber einer Glukose-Stimulation herabgesetzt, die Sekretionsantwort erfolgte verzögert und insgesamt vermindert. Dies konnte, wenn auch nicht so deutlich, ebenfalls nach Elimination von hGH im Anschluß an die Präperifusion beobachtet werden. Auf die Glukose-induzierte Insulinantwort wirkte das antidiuretische Hormon (ADH) supprimierend, der Effekt war nicht konzentrationsabhängig. Nach ADH-Präperifusion verlief die durch Glukose hervorgerufene Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle schneller und erreichte höhere Werte. Beließ man das Vasopressin auch während der Glukose-Stimulation in der Perifusionslösung, so erreichten die Insulinwerte dagegen nur ca. 50 % der Ergebnisse unter Kontrollbedingungen. Lipotropin zeigte eine konzentrationsabhängige inhibierende Wirkung auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion. Durch Präperifusion von Lipotropin wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige suppressierende Wirkung von Lipotropin auf die Insulinsekretion gefunden, die sich auch nach Weglassen des Hormons aus dem Perifusat zeigen ließ.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß hGH und Lipotropin eine chronische Veränderung in der Funktion der beta-Zellen bewirken dürften. Dies könnte z.B. in Form einer Modifikation der Rezeptormoleküle an der beta-Zellmembran geschehen. Bei der Wirkung von ADH dagegen handelt es sich um eine kurzfristige, rasch reversible Beeinflussung der Insulin-produzierenden Inselzellen, die unter Umständen durch einen Eingriff in den Kalziumhaushalt oder das Adenylzyklase-System der beta-Zelle hervorgerufen sein könnte.

Es werden mögliche Gründe diskutiert, die die teilweise sehr widersprüchlichen Ergebnisse über die Hormonwirkungen auf die Insulinsekretion erklären können.

LITERATURVERZEICHNIS

1. LANGERHANS, P.:
Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der
Bauchspeicheldrüse (Dissertation)
Berlin 1869
2. MERING, von, J., O.MINKOWSKI:
Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation.
Arch.Exptl.Pathol.Pharmakol. 26 : 371 (1889)
3. BANTING, F.G., C.H.BEST:
Internal secretion of pancreas.
J.Lab.Clin.Med. 7 : 251 (1922)
4. SANGER, F.:
Chemistry of Insulin.
Science 129 : 1340 (1959)
5. STEUER, W.:
Sozialhygiene; sozialmedizinische Grundlagen,
Gesundheitsfürsorge und -vorsorge.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974
6. CERASI, E., R.LUFT:
Plasma insulin response to glucose infusion
in healthy subjects and in diabetes mellitus.
Acta endocr. 55 : 278 (1967)
7. DUNN, SHEEHAN, McLEITCHIE:
Experimental alloxan diabetes in rat.
Lancet II : 382 (1943)
8. GRODSKY, G.M.:
Effects of carbohydrates on secretion of insulin
from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiol. 205 : 638 (1963)
9. ASHCROFT, S.J.H., HEDESKOW, C.J., P.J.RANDLE:
Glucose metabolism in pancreatic islets.
Biochem. J. 118 : 143 (1970)
10. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, D.A.MEGHEW:
A possible role for the adenyl-cyclase system in
insulin secretion.
Journ.Clin.Invest. 46 : 1724 (1967)
11. MATSCHINSKY, F.M., J.E.ELLERMANN:
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J.Biol.Chem. 243 : 2730 (1968)
12. IDAHL, L.A.:
Dynamics of pancreatic beta-cell response to glucose.
Diabetologia 9 : 403 (1973)

13. IDAHL, L.A.:
Dynamics of insulin secretion and glycolysis in
isolated pancreatic islets.
Diabetologia 6 : 657 (1970)
14. MATSCHINSKY, F.M., R.LANDGRAF, J.ELLERMANN, J.KOTLER-BRAJTBUR
Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans.
Diabetes 21 (Suppl.2) : 555 (1972)
15. LANDGRAF, R.:
Untersuchungen über Kinetik und Steuerungsmechanismen
der Insulinsekretion.
Habilitationsschrift, München 1974.
16. IDAHL, L.A., B.HELLMAN:
Microchemical assays of glucose and glucose-b-
phosphate in mammalian pancreatic B-cells.
Acta endocr. (Kbh.) 59 : 479 (1968)
17. LANDGRAF, R., J.KOTLER-BRAJTBURG, F.M.MATSCHINSKY:
Kinetics of insulin release from the perfused rat
pancreas caused by glucose, glucosamine and galactose.
Proc.Nat.Acad.Sci., US., 68 : 536 (1971)
18. ASHCROFT, S.J.H., J.R.CROSSLEY:
The effects of glucose, n-acetylglucosamine,
glyceraldehyde and other sugars on insulin
release in vivo.
Diabetologia 11 : 279 (1975)
19. MALAISSE-LAGAE, F., W.J.MALAISSE:
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced
insulin release. III. Uptake of ⁴⁵-calcium by
isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88 : 72 (1971)
20. MALAISSE, W.J.:
Calcium-antagonists and islet function. V. Effect
of R 33711.
Horm.Metab.Res. 8 : 434 (1976)
21. LACY, P.E., M.M.WALKER, C.J.FINK:
Perfusion of isolated rat islets in vitro.
Participation of the microtubular system in the
biphasic release of insulin.
Diabetes 21 : 987 (1972)
22. LACY, P.E., N.J.KLEIN, C.J.FINK:
Effect of cytochalasin B on the biphasic release
of insulin in perfused rat islets.
Endocrinology 92 : 1458 (1973)
23. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, M.O.WALKER, P.E.LACY:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced
insulin release. V. The participation of a micro-
tubular-microfilamentous system.
Diabetes 20 : 257 (1971)

24. VAN OBERBERGHE, E., G.SOMERS, G.DEVIS, M.RAVAZZOLA,
F.MALAISSÉ-LAGAE, L.ORCI, W.J.MALAISSÉ:
Dynamics of insulin release and microtubular-
microfilamentous system. VII. Do microfilaments
provide the motive force for the translocation
and extraction of beta granules?
Diabetes 24 : 892 (1975)
25. LACY, P.E., S.L.HOWELL, D.A.YOUNG, C.F.FINK:
New hypothesis of insulin secretion.
Nature (Lond.) 219 : 1177 (1968)
26. MONTAGUE, W., J.R.COOK:
The role of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate
in the regulation of insulin release by isolated
rat islets of Langerhans.
Biochem.J. 122 : 115 (1971)
27. BASABE, J.C., N.L.LOPEZ, J.K.VICTORIA, F.W.WOLF:
Insulin secretion studied in the perfused rat
pancreas. II. Effect of glucose, glucagon,
3'5'-adenosine monophosphate, theophylline,
imidazole and phenoxybenzamine; their inter-
action with diazoxide.
Diabetes 20 : 457 (1971)
28. ZAWALICH, W.S., R.C.KARL, J.A.FERRENDELLI, F.M.MATSCHINSKY:
Factors governing glucose induced elevation of
cyclic 3'5'-AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11 : 231 (1975)
29. SAMS, D.J., W.MONTAGUE:
The role of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate
in the regulation of insulin release.
Biochem.J. 129 : 345 (1972)
30. RASMUSSEN, H.:
Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine
monophosphate.
Science 170 : 404 (1970)
31. WILLIAMS, R.H. (edit.):
Textbook of Endocrinology. 1974.
32. LAZAROW, A.:
Studies on the isolated islet tissue of fish.
Biol.Bull. 113 : 414 (1957)
33. HELLERSTRÖM, C.:
A method for microdissection of intact pancreatic
islets of mammals.
Acta endocr. (Kbh.) 45 : 122 (1964)
34. MOSKALEWSKI, S.:
Isolation and culture of the islets of Langerhans
of the guinea pig.
Gen.Comp.Endocr. 5 : 342 (1965)

35. SODOYEZ, J.C., F.SODOYEZ-GOFFAUX, P.P.FOA:
Evidence for an insulin-induced inhibition of
insulin release by isolated islets of Langerhans.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 130 : 568 (1969)
36. LANDGRAF-LEURS, M.M.C., R.LANDGRAF, R.DAFFNER, R.HÖRL:
The stimulatory and inhibitory function of
theophylline on amino-acid-induced insulin
release: studies with the perfused rat pancreas.
Endocrinology 97 : 1416 (1975)
37. BURR, J.M., W.STAUFFACHER, L.BALANT, A.E.RENOLD:
Regulation of insulin release in perfused pan-
creatic tissue.
Act.diabet.lat. VI (Suppl.1) : 580 (1969)
38. MITSURU HOSHI, W.W.SHREEVE:
Release and production of insulin by isolated,
perfused rat pancreatic islets, control by
glucose.
Diabetes 22 : 16 (1973)
39. FROHMANN, L.A.:
in Joachim H.L. (ed.), Pathology Annual,
Appleton-Century-Crofts, New York (1971) p. 353.
40. SZABO, O., A.J.SZABO:
The effect of hypophysectomy on the function of
the insulin-sensitive central nervous system
glucoregulator receptor.
Endocrinology 97 (3) : 734 (1975)
41. KUO, W.N., D.S.HODGINS, J.F.KUO:
Adenylate cyclase in islets of Langerhans.
(Isolation of islets and regulation of adenylase
cyclase activity by various hormones and agents)
J.Biol.Chem. 248 : 2705 (1973)
42. ROBERTSON, R.P., D.PORTE:
Adrenergic modulation of basal insulin secretion
in man.
Diabetes 22 : 1 (1973)
43. KANETO, A., E.MIKI, K.KOSAKA:
Effect of beta and beta₂ adrenoreceptor stimulants
infused intrapancreatically on glucagon and insulin
secretion.
Endocrinology 97 : 1166 (1975)
44. SAMAAAN, N., S.C.C.YEN, D.GONZALEZ, O.H.PEARSON:
Metabolic effects of placental lactogen (hPL) in
man.
J.Clin.Endocr. 28 : 485 (1968)

45. BECK, P., R.P.EATON, O.M.ARNETT, R.N.ALSEVER:
Effect of contraceptive steroids on arginine-
stimulated glucagon and insulin secretion in women.
Metabolism 24 : 1055 (1975)
46. LENZEN, S., U.PANTEN, A.HASSELBLATT:
Thyroxine treatment and insulin secretion in the
rat.
Diabetologia 11 : 49 (1975)
47. LENZEN, S., H.G.JOOST, A.HASSELBLATT:
The inhibition of insulin secretion from the per-
fused rat pancreas after thyroxine treatment.
Diabetologia 12 : 495 (1976)
48. UNGER, R.H., L.ORCI:
The essential role of glucagon in the pathogenesis
of diabetes mellitus.
Lancet I : 14 (1975)
49. LAUBE, H., R.D.FUSSGÄNGER, V.MAIER, E.F.Pfeiffer:
Hyperglucagonemia of the isolated perfused pancreas
of diabetic mice.
Diabetologia 9 : 400 (1973)
50. MÜLLER, W.A., G.R.FALOONA, E.AGUILAR-PARADA, R.H. UNGER:
Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response
to carbohydrate and protein ingestion.
New Eng.J.Med. 283 : 109 (1970)
51. SAMOLS, E., J.TYLER:
Glucagon-insulin interrelationships.
In: Glucagon Molecular Physiology, Clinical and
Therapeutic Implications.
Lefebvre J. and Unger R.H. (eds.), New York,
Pergamon Press, p. 151 (1972)
52. MCINTYRE, N., C.D.HOLDSWORTH, D.S.TURNER:
Intestinal factors in the control of insulin
secretion.
J.Clin.Endocr. 25 : 1317 (1965)
53. REHFELD, J.F., F.STADIL:
The effect of gastrin on basal and glucose stimulated
insulin secretion in man.
J.Clin.Invest. 52 : 1415 (1973)
54. FRAME, C.M., M.B.DAVIDSON, R.A.L.STURDEVANT:
Effects of the octapeptide of cholecystokinin on
insulin and glucagon secretion in the dog.
Endocrinology 97 : 549 (1975)
55. DANIELSON, A., A.LERNMARK:
Effects of pancreozymin and secretion on insulin releas
and the role of the exocrine pancreas.
Diabetologia 10 : 407 (1974)

56. HINZ, M., N.KATSILAMBROS, B.SCHWEITZER, S.RAPTIS, E.F.PFEIFFER
The role of the exocrine pancreas in the stimulation
of insulin secretion by intestinal hormones.
Diabetologia 7 : 1 (1971)
57. ENK, B.:
Secretion-induced insulin responses. II. Dose-
response relation.
Acta endocrinologica 82 : 314 (1976)
58. LERNER, R.L., D.PORTE:
Studies of secretin-stimulated insulin response in man.
J.clin.Invest. 51 : 2205 (1972)
59. HAYES, J.R., J.ARDILL, K.D.BUCHANAN:
Gastrin and insulin release.
Diabetologia 11 : 89 (1975)
60. SCHANDER, P., B.SCHINDLER, U.PANTEN:
Modulation by gastric inhibitory polypeptide and
glucagon of the dose response relationship between
d-glucose, d-glyceraldehyde, l-leucine or a-keto-
isocaproic acid and insulin release from isolated
rat pancreatic islets.
Diabetologia 12/4 : 232 (1976)
61. PEDERSON, R.A., J.C.BROWN:
The insulinotropic action of gastric inhibitory
polypeptide in the perfused isolated rat pancreas.
Endocrinology 99 : 780 (1976)
62. SCHANDER, P., J.C.BROWN, H.FREDRICH, W.CREUTZFELDT:
Gastric inhibitory polypeptide effect on glucose-
induced insulin release from isolated rat pancreatic
islets in vitro.
Diabetologia 11 : 483 (1975)
63. HOUSSAY, B.A., M.A.MAGENTA:
Rev.Asoc.Med.Argentin. 37 : 389 (1924)
64. MARTIN, J.M., J.J.GAGLIARDINO:
Effect of growth hormone on the isolated pancreatic
islets of rat in vitro.
Nature 213 : 630 (1967)
65. CERASI, E., R.LUFT:
Insulin response to glucose loading in acromegaly.
Lancet II : 769 (1964)
66. LUFT, R., E.CERASI:
Effect of human growth hormone on insulin production
in panhypopituitarism.
Lancet II : 124 (1964)

67. MITCHELL, M.L., M.S.RABEN, M.ERNESTI:
Use of growth hormone as a diabetic stimulus in man.
Diabetes 19 : 196 (1970)
68. LOVE, T.A., K.E.SUSSMAN, R.F.TIMMER:
The effect of adrenocorticotrophic hormone on plasma
insulin and blood glucose in the adrenalectomized
rat.
Metab. 14 : 632 (1965)
69. RATHGEB, J., B.WINKLER, R.STEELE, N.ALTSZULER:
Effect of ovine prolactin administration on glucose
metabolism and plasma insulin levels in the dog.
Endocrinology 88 : 718 (1971)
70. LANDGRAF, R., M.M.C.LANDGRAF-LEURS, A.WEISSMANN, R.HÖRL,
K.von WERDER, P.C.SCRIBA:
Prolactin: A diabetogenic hormone.
Diabetologia 13 : 99 (1977)
71. BORCHARDT, L.:
Die Hypophysenglykosurie und ihre Beziehung zum
Diabetes bei der Akromegalie.
Z.Klin.Med. 66 : 332 (1908)
72. BALASSE, E.:
Action insulino-mimetique de la vasopressine chez
le chien.
Arch.Intern.Pharmacodyn. 161 : 392 (1966)
73. BEST, C.H., N.B.TAYLOR:
A physiological basis of medical practice: A text
in applied physiology (ed. 7), London, Bailliere,
Tindall and Cox, 1961
74. FUSSGÄNGER, R.D., M.SCHLEYER, E.F.PFEIFFER:
Correlative insulin and glucagon secretion of the
perfused rat pancreas following pituitary peptides.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173 : 105 (1973)
75. SURYANARAYANA, B.V., J.R.KENT:
Plasma glucose response to natural vasopressin in
maturity onset diabetics and adult nondiabetics.
Metabolism 18 : 241 (1969)
76. WEISWEILER, P., P.SCHWANDT:
Biological action of the lipotrophic peptides A
and B from pig pituitary glands.
Acta endocr. 79 : 34 (1975)
77. SCHWANDT, P., P.WEISWEILER, M.PIEPER, H.LYDTIN, M.MARSHALL:
In vivo-Untersuchungen beim Miniaturschwein mit einem
lipidmobilisierenden Polypeptid aus Schweinehypophysen
Res.exp.Med. 158 : 246 (1972)

78. LACY, P.E., M.KOSTANOVSKY:
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16 : 35 (1967)
79. IDAHL, L.A.:
A micro perfusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediates metabolites and insulin release.
Analyt.Biochem. 50 : 386 (1972)
80. LACY, P.E.:
Long-term perfusion of isolated rat islets in vitro.
Diabetes 25 : 484 (1976)
81. HUDSON, M.V.:
System for perfusing isolated islets of Langerhans effects of change in glucose concentration on insulin release.
Diabetes 18 : 359 (1969)
82. HALES, C.N., P.J.RANDLE:
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate.
Biochem. J. 88 : 137 (1963)
83. BOTTERMANN, P., R.ERMLER, J.HENNER:
A semiautomatic method for immunoassay for insulin and hGH.
Norm.Metab.Res. 3 : 55 (1971)
84. MARSCHNER, I., F.ERHARDT, P.C.SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline function".
Int.Atom.Energ.Ag. 1 : 111 (1974)
85. NORFLEET, W.T., A.S.PAGLIARI, M.W.HAYMOND, F.MATSCHINSKY:
Comparison of alpha- and beta-cell secretory responses in islets isolated with collagenase and in the isolated perfused pancreas of rats.
Diabetes 24 : 961 (1975)
86. GRODSKY, G.M.:
A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling.
J.Clin.Invest. 51 : 2047 (1972)
87. BRISSON, G.R., W.J.MALAISSÉ:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XI. Effects of theophylline and epinephrine on ⁴⁵Ca-efflux from perfused islets.
Metabolism 22 : 455 (1973)
88. COORE, H.G., P.J.RANDLE:
Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem.J. 93 : 66 (1964)

89. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, S.KING, P.H.WRIGHT:
Effect of growth hormone on insulin secretion.
Am.J.Physiol. 215 : 423 (1968)
90. CURRY, D.L., L.L.BENNETT, C.H.LI:
In vitro enhancement of insulin secretion by
growth hormone.
Biochem.biophys.Res.Commun. 60 : 146 (1974)
91. ADAMSON, U.:
Insulin-like and diabetogenic actions of human
growth hormone in man.
Stockholm 1975
92. KIPNIS, D.M., M.F.STEIN:
Ciba Found.Coll.Endocr. 15 : 156 (1964)
93. TRYGSTAD, O.:
The lipid.mobilizing effect of some pituitary
gland preparations. III. A purified human
pituitary lipid-mobilizing factor (LMF) with
hyperglycemic activity.
Acta endocr. 58 : 277 (1968)
94. YOUNG, F.G.:
A permanent experimental diabetes produced by
pituitary (anterior lobe) injections.
Lancet II : 372 (1937)
95. HOUSSAY, B.A.:
Diabetogenic action of purified anterior pituitary
hormones.
Endocrinology 45 : 627 (1949)
96. SCHATZ, H. et al.:
Hypophysis and function of pancreatic islets.
I. The influence of hypophysectomy on insulin
secretion and biosynthesis of proinsulin and
insulin in isolated pancreatic islets of rats.
Diabetologia 9 : 135 (1973)
97. MERIMEE, T.J., S.E.FINEBERG:
Pancreatic compartmentalization of insulin.
Evidence for pituitary control.
Diabetes 22 : 25 (1973)
98. CURRY, D.L., L.L.BENNETT:
Dynamics of insulin release by perfused rat
pancreas: Effects of hypophysectomy, growth hormone,
adrenocorticotrophic hormone and hydrocortisone.
Endocrinology 93 : 602 (1973)
99. BENNETT, L.L., D.L.CURRY, CHOH HAO LI:
Enhancement of insulin secretion by human chorionic
somatomammotropin and related hormones.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 152 : 281 (1976)

100. MALAISSE, W.J.:
Effects of pregnancy and chorionic growth hormone
upon insulin secretion.
Endocrinology 84 : 41 (1969)
101. EHRLICH, R.M., P.J.RANDLE:
Serum growth hormone concentrations in diabetes
mellitus.
Lancet II : 233 (1961)
102. LUFT, R., R.GUILLEMIN:
Growth hormone and diabetes in man. Old concepts -
new implications.
Diabetes 23 : 783 (1974)
103. HANSEN, A.P.:
Normalization of growth hormone hyperresponse to
exercise in juvenile diabetics after "normalization"
of blood sugar.
J.Clin.Invest. 50 : 1806 (1971)
104. HANSEN, K.F.:
Immunoreactive growth hormone in plasma and urine
in juvenile diabetics before and during insulin
treatment.
Acta endocr. (Kbh.) 75 : 50 (1974)
105. LAWRENCE, A., L.FROHMAN, M.McGILLIVRAY, T.ACETO:
Acute effects of human growth hormone on insulin
secretion and glucose utilization in normal and
growth hormone deficient subjects.
J.Clin.Endocr. 27 : 561 (1967)
106. CERASI, E., C.H.LI, R.LUFT:
Some metabolic changes induced by acute administration
of native and reduced tetra-S-carbamidomethylated
human growth hormone in man.
J.Clin.Endocr. 34 : 644 (1972)
107. TAI, T.Y., S.PEK:
Direct stimulation by growth hormone of glucagon
and insulin release from isolated rat pancreas.
Endocrinology 99 : 669 (1976)
108. PARK, C.R., D.H.BROWN, M.CORNBLATH, W.H.DAUGHADAY, M.E.KRAHL:
The effect of growth hormone on glucose uptake by
the isolated rat diaphragm.
J.biol.Chem. 197 : 151 (1952)
109. HJALMÄRSON, A.:
Sensitivity of the rat diaphragm to growth hormone.
Acta endocr. (Kbh.) 57 Suppl. 126 : 1 (1967)

110. KOSTYO, J.L., L.P.GIMPEL, O.ISAKSSON:
In: Levine, R., Luft, R. (eds.)
Advanc.metab.Disord., vol. 8.
Academic Press, New York (1975)
111. ORLOFF, J., J.S.HANDLER:
The cellular mode of action of antidiuretic hormone.
Amer.J.Med. 36 : 686 (1964)
112. FICHMAN, M.P., C.BROOKER:
Deficient renal cyclic AMP production in nephro-
genic diabetes insipidus.
Clin.Res. 20 : 217 (1972)
113. HANDLER, J.S., R.W.BUTCHER, E.W.SUTHERLAND, J.ORLOFF:
The effect of vasopressin and theophylline on the
concentration of adenosine-3',5'-phosphate in
the urinary bladder of the toad.
J.Biol.Chem. 240 : 4524 (1965)
114. GEILING, E.M.K., C.A.EDDY:
Hyperglycemic effect of vasopressin, oxytocin and
pituintrin.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 26 : 146 (1928)
115. KARP, M.:
Changes in blood glucose and plasma insulin,
free fatty acids, growth hormone and hydroxycortico-
steroids during intramuscular vasopressin tests
in children and adolescents.
Acta endocr. 58 : 545 (1968)
116. BERGEN, S.S.:
Glycogenolytic effect of vasopressin in the canine
liver.
Amer.J.Physiol. 199 : 137 (1960)
117. ANSELMINO, K.J., F.HOFFMANN:
Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens.
I. Nachweis, Darstellung und Eigenschaften des Hormons.
Klin.Wschr. 10 : 2380 (1931)
118. TRYGSTAD, O.:
The lipid.mobilizing effect of some pituitary gland
preparations. II. Preparation of a human pituitary
lipid-mobilizing factor (LMF) with hypocalcemic and
hyperglycemic effects in rabbits.
Acta endocr. (Kbh.) 57 : 81 (1968)
119. HELLMANN, B., IDAHL, L.A., A.LERNMARK, J.SEHLIN, and
J.B.TÅLJEDAL:
Membrane sulphydril groups and the pancreatic beta-
cell recognition of insulin secretagogues.
Proc. 8th Congr.Int.Diab.Fed., Excerpta Med. Int.
Congr.Series 312 : 65 (1974)

120. TURCOT-LEMAY, L., A.LEMAY, P.E.LACY:
Somatostatin inhibition of insulin release from
freshly isolated and organ cultured rat islets
of Langerhans in vitro.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 63 : 1130 (1975)
121. VIGNERI, R., S.SQUATRITO, V.PEZZINO, S.FILETTI, S.BRANCA,
P.POLOSA:
Growth hormone levels in diabetes correlation
with the clinical control of the diseases.
Diabetes 25 : 167 (1976)
122. DEVIS, G., W.J.MALAISSIE:
Calcium-antagonists and islet function.
I. Inhibition of insulin release by verapamil.
Diabetes 24 : 547 (1975)
123. RUDMAN, D., A.E.DEL RIO, L.A.GARCIA, J.BARNETT, C.H.HOWARD,
W.WALKER, G.MOORE:
Isolation of two lipolytic pituitary peptides.
Biochemistry 9 : 99 (1970)
124. BURR, J.M.:
Perifusion of rat pancreatic tissue in vitro:
Substrate modification of theophylline-induced
biphasic insulin release.
J.Clin.Invest. 49 : 2097 (1970)
125. GOTTSMANN, M., T.EVERSMANN, J.HABERMANN, G.ULBRECHT,
K.v.WERDER:
Stress induced secretion of pituitary hormones.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 212 : 156 (1977)
126. MOLTZ, J.H., C.P.FAWCETT, S.M.McCANN:
The hypothalamo pancreatic axis: evidence for a
neurohormonal pathway in the control of the
release of insulin and glucagon.
Endocr.Res.Comm. 2/8 : 537 (1975)

Lebenslauf

Am 31.10.1949 wurde ich als Sohn des Soldaten Gerhard Witte und seiner Ehefrau Erika, geb. Schudt, in Bad Nauheim geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule, zunächst in Bad Nauheim, dann in Wiesbaden und zuletzt in Fürstenau. Anschließend trat ich in das Gymnasium in Quakenbrück ein, wechselte später auf das Leopoldinum in Detmold und abschließend auf das Rupprechtgymnasium in München. Dort legte ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Juli 1969 wurde ich für zwei Jahre zur Bundeswehr nach Berchtesgaden einberufen.

Mit dem Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1971 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier bestand ich im Oktober 1973 das Physikum, im August 1974 den ersten, im August 1976 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Anschließend absolvierte ich in München das Praktische Jahr an der Universitäts-Kinderklinik, der Medizinischen Universitätsklinik Innenstadt und der II. Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing. Mein Studium werde ich im Oktober 1977 mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung abschließen.

Von Oktober 1974 bis Dezember 1976 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit.

Herrn Priv.Doiz.Dr. R. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit. Herrn Professor Dr. E. Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Professor Dr. P.C. Scriba und Frau Dr. M. Landgraf-Leurs danke ich für die freundliche Unterstützung und nützliche Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

Meiner Kollegin, Frau A. Magerl, mit der ich den methodischen Teil dieser Arbeit gemeinsam erarbeitet habe, danke ich für die gute Kooperation. Die stets konstruktive Unterstützung durch Fräulein R. Hörl verdient ganz besondere Anerkennung.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. P. Schwandt, Herrn Dr. E. Uhlich, Frau Dr. Neureuther und Fräulein Weidl für ihre Hilfe und die Beschaffung von Material, Herrn L. Bestler und Fräulein F. Haag sowie Frau M. Preisendanz für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

